

## Tesis Doctoral

# Respuesta al daño al ADN: un ejemplo de acoplamiento entre transcripción y splicing alternativo

Muñoz, Manuel Javier

2009

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Muñoz, Manuel Javier. (2009). Respuesta al daño al ADN: un ejemplo de acoplamiento entre transcripción y splicing alternativo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

#### Cita tipo Chicago:

Muñoz, Manuel Javier. "Respuesta al daño al ADN: un ejemplo de acoplamiento entre transcripción y splicing alternativo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**Universidad de Buenos Aires**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
**Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular**



**Respuesta al Daño al ADN:**

**Un Ejemplo de Acoplamiento entre Transcripción y *Splicing* Alternativo**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el  
área Ciencias Biológicas

**Lic. Manuel Javier Muñoz**  
**Director de Tesis: Alberto R. Kornblihtt**

**Lugar de Trabajo:**  
**Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, IFIBYNE-CONICET**

Buenos Aires, 2009

## Resumen

El *splicing* alternativo (AS) explica cómo se obtiene una gran cantidad de proteínas a partir de una cantidad limitada de genes. Este proceso es afectado no sólo por la interacción de proteínas reguladoras del AS con sus secuencias blanco en los pre-mRNAs sino que, dado que ocurre en íntimo contacto con la maquinaria transcripcional, es también afectado por ésta (acoplamiento transcripción/AS). Interesantemente, un gran número de genes involucrados en apoptosis son regulados por *splicing* alternativo produciendo mRNAs que codifican para proteínas con funciones antagónicas. Sin embargo poco se sabe sobre la regulación del AS en condiciones de estrés. En esta tesis se ha investigado cómo la respuesta al daño al DNA inducido por la luz UV provoca cambios en los patrones de AS de minigenes transfectados transitoriamente o de genes endógenos como Bcl-x y caspasa 9. El UV induce la hiperfosforilación del dominio carboxilo terminal (CTD) de la RNA polimerasa II (pol II) y consecuentemente con esto afecta preferencialmente el AS co-transcripcional. El efecto de UV es sistémico ya que el daño del DNA molde no es necesario y no involucra al factor de transcripción p53 como demostramos al utilizar células que carecen de éste clásico factor de respuesta a estrés. Utilizando la técnica de FRAP, en combinación con polimerasas mutantes en su CTD que imitan no sólo el estado hiperfosforilado sino también los efectos de la luz UV sobre el AS, demostramos que la hiperfosforilación del CTD inhibe la tasa de elongación de la pol II afectando así el acoplamiento entre la transcripción y el AS. Confirmando la relevancia de este mecanismo, la apoptosis inducida por luz UV en células p53<sup>-/-</sup> es prevenida al revertir el cambio en el AS de Bcl-x. Para evaluar la generalidad de nuestros resultados utilizamos *microarrays* de AS y encontramos que la irradiación con UV promueve una mayor proporción de cambios en AS en el grupo de genes donde también ha afectado su transcripción. Estos resultados sugieren que el acoplamiento entre la transcripción y el AS es clave en la respuesta al daño en el DNA.

## Abstract

Alternative splicing (AS) explains how a vast protein diversity is achieved with a limited number of genes and its regulation not only depends on the interaction of splicing factors with their target sequences in the pre-mRNA but is coupled to RNA polymerase II (pol II) transcription. AS seems to play a key role in DNA damage response as suggested by the large number of apoptotic genes that are alternatively spliced, with often antagonistic roles of the isoforms generated. However, little is known about AS regulation in a DNA damage derived stress situation. In this thesis we show that ultraviolet (UV) radiation affects alternative splicing of transfected and endogenous genes like Bcl-x and caspase 9 (C9). UV light induces the hyperphosphorylation of the carboxy terminal domain of the pol II and by doing so it affects co-transcriptional AS preferentially. The UV effect is systemic as demonstrated by the fact that the actual damage of the DNA template *in cis* is not necessary and also p53 independent because it is observed in cells lacking this classic stress response factor. By using the FRAP technique and in combination with mutant polymerases that not only mimic the hyperphosphorylated state of its CTD but also the UV effect on AS, we demonstrated that the UV induced CTD hyperphosphorylation inhibits pol II transcriptional elongation rates which in turn affects AS decisions through its coupling with transcription. Confirming the relevance of this mechanism, apoptosis promoted by UV light in cells lacking p53 is prevented when the change in AS of the apoptotic gene Bcl-x is reverted. To evaluate the generality of these results and using splicing-sensitive microarrays, we found a significant overlap of the subsets of genes changing AS with UV light and those that also downregulate their expression, suggesting that transcription/AS coupling is a key feature of the DNA damage response.

## Gracias a

Gracias al grupo como un todo.

Gracias a ARK por haber sido mi maestro en esta cosa de la ciencia.

Gracias al Pampeano por ser nuestro jugador más habilidoso y por pasar la pelota siempre bien redonda. Por la notable (para vos pampa!) notable buena onda.

Gracias al Fede, mi compadre en las buenas y en la malas. De día y de noche.

Gracias al gordini Petry, un TRE-MEN-DO hinchapelotas completamente A-DO-RA-BLE. Vamos por más noches de birra y play2 gordo!

Gracias a Mati, por todas las historias que tenemos juntos, por todas las charlas, por todas las preguntas sin respuesta que tenemos los dos.

Gracias al Nachiiiiiii por la predisposición, por la música, por la guitarreadas y por pegarle a Petry cuando yo estoy cansado de hacerlo.

Gracias a la Pinguineta por tanta pasión futbolera que nos hace olvidar de los 80 RNAs que estamos haciendo y por el “telefonito negro de arriba”.

Gracias al Dr. Cow alias J.P. Fededa, por tanto caos y por la buena onda que pegamos después de un comienzo con dudas.

Gracias a Anabell, por preocuparse por nosotros todos y por toda la burocracia que me ayudaste a resolver... creo que hasta te pregunté “acá donde dice apellido que pongo?”. Sí, me respondió!

Gracias a Guada, por bancar el primer cimbronazo.

Gracias a Vale, por ser el sol alrededor del cual todos damos vueltas todos los días. La definición de bondad en mi diccionario. Gracias a su negro hermoso, digno compañero de Val. Son lo más.

Gracias a Rosco por hablar y hablar y hablar y hablar y hablar y hablar y hablar y hablar y hablar y  
hablar y hablar y hablar y hablar y hablar y hablar y hablar y hablar y hablar y hablar y hablar y  
hablar y hablar y hablar y hablar y hablar y hablar y hablar y hablar y hablar y hablar y hablar y  
hablar y hablar y hablar y de pronto reírse y decirme “qué haces pájaro loco?” e irse. Y al rato volver.... si...  
a seguir hablando. Un personaje bárbaro. Vové!!!!

Gracias al Risooooonnnnggg por ser la persona más testaruda que conocí, por esa risa contagiosa y por todas las guitarreadas y cositas ricas de Carmen.

Gracias a la Sole, por haber ayudado a que esta tesis sea hecha.

Gracias a Celi, por ser Courtney Love y por coparse tanto con todo.

Gracias a Lean Q., por apagar el agua para el té en Pinamar desoyendo los gritos de TODOS nosotros que al unísono decíamos “Lean, no apagues el fuego”. Buena onda!! Nunca se dio cuenta!!!

Gracias a todos los que hacen posible el día a día, Juana, Leo, Andrada (que asados mamita...), Marion, Patricia... (los puntos suspensivos indican que creo que me olvidé de alguien, perdón si así es).

Gracias a los EAs por prestarnos nuestras cosas y las de ellos, por llevarse las bachas de todos, por ser tantos, por romper la -80, por anotarse compulsivamente en cultivo (incluso cuando tienen una reunión de grupo de 7 horas...). Pero va con onda! Gracias además a Damia por haber estoicamente soportado ser mi co-ministra y por soportar con una sonrisa todos mis comentarios 100/ desubicados (los que fueron con buen humor y los que fueron con mal humor), a Jime por la onda y los puchos, a Marian H por hacerme reír sólo con decir “okey” o “what’s up dude?”, a Juan por bancarse mi mal humor cultivo-dependiente, al Jose!!! Vuelve loco!!! Eh!! Vamo lo pibe!!

Gracias a los Coso, por lo mates y las charlas. Gracias a Omar porque cuando no está “chinchudo” hablamos de pilchas (vamos... no sean tímidos, a todos nos gusta hablar de pilchas).

Gracias a Paula y a Flor por la onda.

Gracias a los Colman por contener a Colman en una región finita del espacio. Gracias a Alan, el descubrimiento del verano cordobés, Gracias a Lu, una masa, al Rodrigo por ser tan morfón al fútbol y por la yerba y los mates y a los nuevos, no sé, gracias porque me pintó nomas. Gracias a Colman por la buena onda, por interesarse en mi trabajo y por haberme traído la compu que estoy usando ahorita mismo.



La cosa empieza temprano.

Manu: "Si?"

Manu: "ay Manolet... ahora hago"

ALERTA: MENTIRA.

NO PORQUE PAMPA NO HAGA MATE, SINO PORQUE CUANDO DICE AHORA "X" NO LO HACE.

Sigo.

Entra Petry (pónganle 9 y media de la mañana, en lo personal completamente dormido preguntándome dónde habré dejado el western de ayer o algo relacionado al desorden). Petry: “*Sweeeeeeeetttttt child of mineeeeeee yeaghhh baby!*”.

Repito.

9:30.

Y el gordo entra cantando Guns a pleno... “que haces Nagu!!? (uno de mis apodos). Se copa y hace mate (eso hay que reconocérselo y también toca bien la armónica y también muchas cosas más).

Entra Vale (sonrisa, buena onda y probablemente con algo para alimentarnos).

(Celi, que estaba adentro de la compu sale y relojea el morfi).

Val: Hola!

Todos a coro, Holaaa Val!

Entra Fede: Te odio. Que trajiste de comer? Te odio. Gordo (a Petry) te odio.

Y vos que miras pampeano? Te odio.

Y a vos también te odio (a mi) con esa banda de pop que tenes.

Petry interrumpe con tono Pomelo: “Sííííí, tienes una banda de pop, porque yo soy el rock, entendés? Yo soy Pomelo, Asistenteeeeee!” Puede que hable todo el día como Pomelo. Eso complicara todo. Mal. Y si se engancha con Fede a bardear hay que irse directamente, se te paran al lado y te dicen (en realidad hablan entre ellos) “ay! No lo jodas, no ves que está haciendo ERRE ENE A, no le hables, dejalo que esta tra-ba-jan-do ay... si si, el hace ERRE ENE A ay!”

Sigue Fede: Los odio, soy el más lindo, se ríe, se va gritando “Guilleeeee”, vuelve.

“Los odio”. “A ver si entre todos juntamos una gana de hacer el doctorado”.

Teléfono: Es ARK “alguien necesita algo de mí? Y pasa el itinerario del día (enorme e imposible de recordar).

Entra Mati: (serio) Gordo, te odio (a Petry, obvio). (ahora relajado) Hola Nolis! (otro de mis apodos) Hola pampa, que lindo sos! Hola Peenguin! (al comienzo no lo escucha, esta con los auriculares) Nachi!!! (Nachi largando real times y escuchando Pink Floyd... eso calma mucho a Fede) Sigue Mati: Vale!!!!

Se va a mandar mails tocándose la barbita.

Entra Anabell "hay un mate?" "uh... que rico un matecito!"

Val: alguien quiere células? TODOS le pedimos células y en lo personal una hora después le pregunto qué le pedí... la memoria RAM de Val para las células es tremenda. Se va a cultivo. No la veremos por horas.

Me choco contra o la puerta o la silla de nacho, Petry se ríe (esto pasa muy seguido).

Entra Dr. Cow: "Buenassssssss! me voy al microscopio de los Colman"

La cosa se acomoda, cada uno a lo suyo.

Al rato

Petry a Manu: “Sí, yo no quiero decir nada, pero Justi me tira onda viste...” Manu mira...

Pinguin: "Uhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh, lo que te dijo el vaguito!!!! No no no, matalo!!!! A bueno, no sé, yo digo nomas eh?".

Entra Nacho corriendo y le pega un cabezazo en el hombro a Petry.

Penguin: "Uhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh"

Nacho abraza a Petry que se agarra el hombro.

Entra Vale, se toma un mate, lo defiende a Petry y vuelve a cultivo.

Alguien dice: “¿llueve afuera?”

Alguien responde: "ni idea"

Entra Damia para hablar con Petry. Yo: "Damia, andate a tu laboratorio". A Damia no le importa.



Y funciona nomás.

***Para la flia entera, los quiero***

**De mi viejo para mí hace algunos años:**

***“Hijo, a la patota, al medio”***

## Publicaciones

### Trabajos originales

- Muñoz M.J., Pérez Santangelo S., Paronetto M.P., de la Mata M, Pelisch F., Boireau S., Glover-Cutter K., Ben-Dov C., Blaustein M., Lozano J.J., Bird G., Bentley D., Bertrand E., Kornblihtt A.R.  
DNA Damage Regulates Alternative Splicing through Changes in Pol II Elongation.  
*Cell*, en prensa, 2009.
- Pearson JL, Robinson TJ, Muñoz MJ, Kornblihtt AR, Garcia-Blanco M.A. Identification of the cellular targets of the transcription factor TCERG1 reveals a prevalent role in mRNA processing.  
*J Biol Chem*. 2008; 283(12):7949-61.
- Blaustein M., Pelisch F., Tanos T., Muñoz M. J., Wengier D., Quadrana L., Sanford J. R., Muschietti J. P., Kornblihtt A. R., Cáceres J. F., Coso O. A., Srebrow A. Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT.  
*Nat Struct Mol Biol*. 2005;12(12):1037-44.
- Nogues G, Muñoz M.J., Kornblihtt A.R. Influence of polymerase II processivity on alternative splicing depends on splice site strength.  
*J Biol Chem*. 2003. 278(52):52166-71.

### Revisiones

- Kornblihtt A.R., de la Mata M, Fededa J.P., Muñoz M.J., Nogues G. Multiple links between transcription and splicing.  
*RNA*. 2004. 10(10):1489-98.

<b>Introducción general.....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	
<b>1. Transcripción.....</b>	<b>4</b>
1.1 La Transcripción de los mRNAs.....	5
1.2 El CTD de la RNA polimerasa II.....	7
1.3 Algunas modificaciones post-traduccionales del CTD.....	8
1.4 La fosforilación del CTD y la transcripción.....	11
1.5 La elongación de la pol II y sus etapas.....	12
1.6 Más sobre factores que afectan la elongación.....	15
1.7 La fosforilación del CTD y la elongación transcripcional. El rol de P-TEFb.....	17
<b>2. Procesamiento del mRNA. <i>Splicing</i>.....</b>	<b>18</b>
2.1 Arquitectura de un pre-mRNA.....	20
2.2 <i>Splicing</i> alternativo.....	22
2.3 Proteínas SRs y hnRNPs.....	23
2.4 Acoplamiento Transcripción-Procesamiento.....	26
2.5 Acoplamiento Transcripción- <i>Splicing</i> .....	29
2.6 Transcripción y <i>splicing</i> alternativo	
Primeras evidencias: Promotores.....	31
Dos modelos no excluyentes. Reclutamiento y Elongación.....	32
<b>3. El daño al DNA.....</b>	<b>35</b>
3.1 Mecanismos de reparación de daño.....	36
3.2 La transcripción post-daño.....	37
<b>4. Muerte Celular Programada.....</b>	<b>40</b>
4.1 Apoptosis: Aspectos morfológicos.....	41
4.2 Apoptosis: Aspectos moleculares.....	42
<b>5. Genes estudiados en esta tesis.....</b>	<b>49</b>

<b>Objetivos.....</b>	<b>51</b>
<b>Resultados</b>	
Capítulo I: El UV y el <i>splicing</i> alternativo del gen de la fibronectina.....	52
Capítulo II: El UV y el <i>splicing</i> alternativo de los genes Bcl-x y Caspasa 9.....	76
Capítulo III: El UV y los cambios globales en los patrones de <i>splicing</i> alternativo...	84
<b>Conclusiones.....</b>	<b>87</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>90</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>100</b>
<b>Anexo, <i>microarray</i>.....</b>	<b>113</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>124</b>

## Introducción general

La biología es el estudio de los seres vivos (del griego *bios*, vida y *logos*, estudio, ciencia). Sin embargo, si intentásemos definir qué es la vida nos encontraríamos, probablemente, envueltos en una gran discusión en la cual cada uno aportaría su punto de vista (un pequeño resumen de lo que es la ciencia). Podríamos decir que los organismos vivos se reproducen por sí mismos, que requieren energía, que la transforman para ordenarse y que por consecuencia desordenan el medio ambiente, que cambian, que se desarrollan (otra palabra difícil de definir). Discutiríamos si los virus son seres vivos o no. Pero coincidiríamos en un punto: los organismos vivos responden activamente ante situaciones que se les presentan. Con mayor o menor número de actores involucrados, con mayor o menor complejidad, tanto una bacteria como un mamífero son capaces de reaccionar ante cambios en el medio interno y externo. La evolución ha seleccionado tres jugadores principales para esta tarea. El DNA (ácido desoxirribonucleico, ADN), el RNA (ácido ribonucleico, ARN) y las proteínas.

- El primero es aquél que posee en su estructura la información necesaria para la vida.
- El segundo la transmite y amplifica.
- Y el tercero es el que, en la mayoría de los casos, realiza el trabajo.

Es claro que hay muchos trabajos por realizar y la cantidad y calidad de trabajos que realiza una bacteria o un mamífero no son equivalentes (aunque hay muchos en común). Uno es más complejo, en el sentido de que es capaz de hacer más trabajos que el otro.

La comparación de los genomas de distintos organismos indica que el aumento en el número de genes no correlaciona con la complejidad del organismo analizada en términos morfológicos y comportamentales. Por ejemplo, el gusano *Caenorhabditis elegans* posee cerca de 20.000 genes (Ruvkun y Hobert 1998) pero carece de muchos de los tipos celulares y tejidos presentes en la mosca *Drosophila melanogaster*, la cual posee menos de 14.000 genes (Adams, Celniker et al. 2000). De hecho, la revelación de que el genoma humano contiene aproximadamente 20.000/25.000 genes, precipitó el desconcierto sobre las bases moleculares de la complejidad de los organismos (Baltimore 2001; Lander, Linton et al. 2001; Harrison, Kumar et al. 2002). Quedó claro entonces que la clave para explicar la complejidad de un organismo no era el número total de genes sino más bien

cuál era la información contenida en esos genes, cómo y cuándo se manifestaba o era expresada y cómo era amplificada.

Ante ésta difícil tarea surgieron dos tendencias (en absoluto excluyentes):

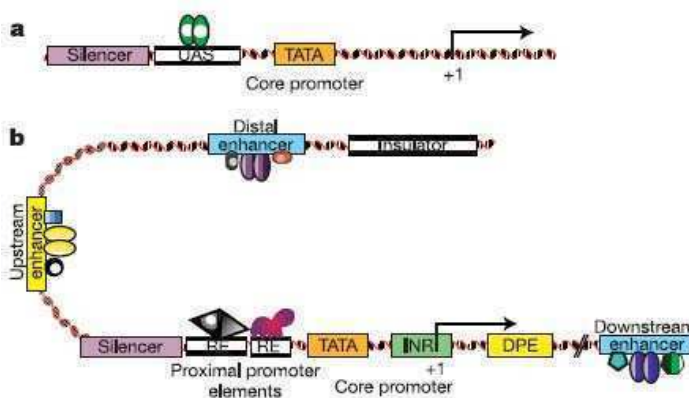
- La que explicaba la complejidad de un organismo gracias a patrones de transcripción definidos finamente en tiempo y espacio.
- La que explicaba la complejidad de un organismo gracias a la amplificación de la información genética debido, principalmente, al *splicing* alternativo (AS).

Al analizar los genomas de dos organismos eucariotas muy distintos en su complejidad como una levadura o un mamífero se observa que las secuencias de DNA reguladoras de la transcripción están presentes en mayor número y son más complejas mientras más complejo es el organismo. Consecuente con la idea de que los organismos más complejos regulan la expresión de sus genes de manera muy precisa en espacio y tiempo, del 5 al 10% de la capacidad codificante de los metazoos (estimada en sólo el 2% del genoma) está dedicada a proteínas que regulan la transcripción. Por ejemplo, en levaduras se han encontrado cerca de 300 factores de transcripción mientras que en *C. elegans* o *Drosophila* se han encontrado cerca de 1000 y 3000 son los presentes en humanos. Parece entonces que la que la complejidad de los organismos correlaciona con un aumento no sólo en la cantidad absoluta de factores reguladores de la transcripción sino también con la relación entre estos y el número genes: en levaduras hay un factor regulador de la transcripción cada 20 genes mientras que en humanos hay uno cada 10 genes (Levine y Tjian 2003). Dada la naturaleza combinatorial de la regulación transcripcional (un gen, muchos factores de transcripción), el poseer una mayor cantidad de factores de transcripción por gen puede producir una expansión dramática en la complejidad de la regulación de la expresión génica. Esto a su vez es evidenciado por las complejas unidades transcripcionales presentes en los metazoos (Figura. i1). La expresión de la información genética no sólo es regulada a un nivel meramente transcripcional, sino que además es amplificada. El AS es el principal mecanismo que explica cómo el proteoma de los humanos es aproximadamente cuatro veces mayor que su genoma (Black 2000; Graveley 2001; Maniatis y Tasic 2002). Como se ve en la figura i2, el porcentaje de genes con AS aumenta a medida que aumenta la complejidad del organismo.



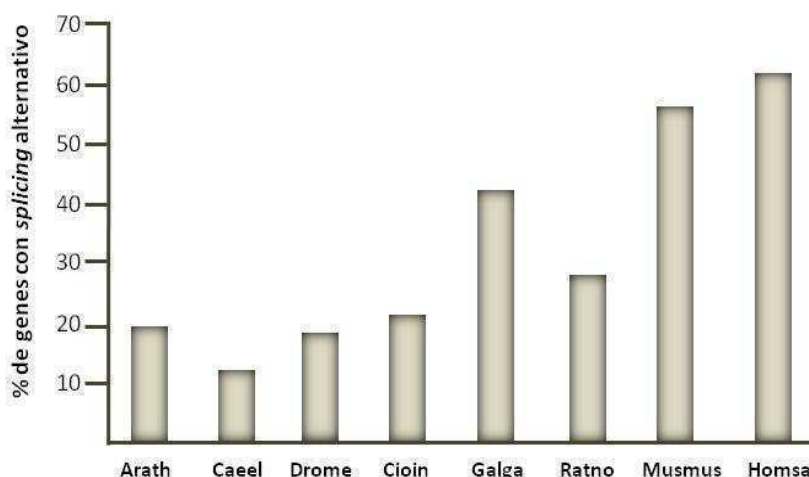
**Figura i1. Comparación de un promotor eucariota de levadura (a) y de mamífero (b)**

**a.** Una sencilla unidad transcripcional eucariota presenta un promotor mínimo (*core promoter*), una secuencia activadora de la transcripción río arriba (*UAS, upstream activator sequence*) y una secuencia represora (*silencer*). **b.** Un complejo modulo de transcripción de un mamífero posee varias secuencias activadoras (*enhancers*), secuencias represoras y secuencias de aislamiento (*insulator*) además de secuencias iniciadoras (*INR, initiator sequence*) y elementos río abajo del promotor (*DPE, downstream promoter elements*) los cuáles pueden reclutar, junto con la secuencia TATA, factores generales de la transcripción (ver más abajo). Extraído de (Levine y Tjian 2003).



**Figura i2. Distintos organismos, distintos niveles de *splicing* alternativo**

Análisis a partir de ESTs del nivel de *splicing* alternativo en diferentes organismos eucariotas, utilizando la base de datos UniGene. (Caeel) *Caenorhabditis elegans*, (Cioin) *Ciona intestinalis*, (Galga) *Gallus gallus*, (Homsa) *Homo sapiens*, (Musmus) *Mus musculus*, (Ratno) *Rattus norvegicus*, (Drome) *Drosophila melanogaster*, (Arath) *Arabidopsis thaliana*. Adaptado de (Kim, Magen et al. 2007).



Más aún, el descubrimiento de que la transcripción afecta el AS (Eperon, Graham et al. 1988; Cramer, Pesce et al. 1997) puso de manifiesto que estos dos procesos pueden, en conjunto, ayudar a definir las características de un organismo.

Esta tesis describe cómo la transcripción y el AS se combinan, por primera vez, para responder ante un estímulo externo.

## Introducción

### 1. Transcripción

La expresión de los genes eucariotas implica la interconexión de distintas maquinarias moleculares que hasta hace poco se creía que trabajaban independientemente. Los pasos íntimamente ligados a la expresión de genes involucran la síntesis del RNA mensajero (mRNA) por la RNA polimerasa II (pol II) en el proceso de transcripción, la modificación en su extremo 5' gracias a la adición del cap (*capping*), la eliminación de regiones no codificantes o intrones y el empalme de los exones (*splicing*) y la modificación del extremo 3' dada por el corte del transcrito y la adición de una cola de poliadenosinas monofosfato (corte y poliadenilación). Todos estos procesos ocurren en el núcleo y se influyen unos a otros (Maniatis y Reed 2002; Proudfoot, Furger et al. 2002; Kornblihtt, de la Mata et al. 2004) permitiendo, entre otras cosas, regular la estabilidad del mensajero, la amplificación de la información genética, modular la traducibilidad del mRNA y la localización del producto proteico. El año 1969 fue clave en el estudio de la transcripción porque fue en ese año que Robert Roeder publicó su trabajo sobre la actividad RNA polimerasa dependiente de DNA de tres fracciones gracias a las cuales hoy conocemos a las RNA polimerasas I, II y III (Roeder y Rutter 1969). La pol II es la responsable de la síntesis de los mRNA en eucariotas y, junto con los factores generales de la transcripción, llevan a cabo el primer paso en la expresión de un gen. La importancia de regular la transcripción, tanto en la diferenciación de tejidos como en una situación patológica por ejemplo, hace que la pol II en sí misma y muchos de sus factores auxiliares sean blanco de múltiples cascadas de señalización. La maquinaria transcripcional eucariota es más compleja que la de procariotas o arqueas pero los principios generales de la transcripción (y su regulación) están conservados. Las bacterias y arqueas poseen sólo una RNA polimerasa, mientras que las células eucariotas poseen las tres polimerasas mencionadas más arriba y una descubierta recientemente de origen mitocondrial (spRNAP-IV) (Kravchenko, Rogozin et al. 2005). Las distintas polimerasas participan en la síntesis de distintas clases de RNA y reconocen por lo tanto secuencias características en el DNA. La RNA pol I transcribe los genes de los precursores 28S, 18S, y 5,8S del RNA ribosomal (rRNA), y es posiblemente la RNA pol más activa. La pol II transcribe los mRNAs de genes que codifican proteínas y algunos RNAs nucleares pequeños (snRNAs) involucrados en procesos como el *splicing*. La pol III transcribe los RNAs 5S ribosomales y los RNAs de transferencia (tRNAs).

1.1 La Transcripción de los mRNAs

La pol II es capaz de desenrollar el DNA, sintetizar el RNA y re-enrollar el DNA, pero es en sí misma incapaz de reconocer el promotor e iniciar la transcripción. Para esta tarea son necesarias las participaciones de los factores de transcripción (unidos a sus secuencias blanco o *enhancers*), de los factores generales de la transcripción (GTFs, *general transcription factors*, TFIIB, D, E, F y H) y del Mediador (complejo que procesa y transmite señales desde los *enhancers* a los promotores).

**Figura i3. La maquinaria transcripcional de la pol II**

Las masas se muestran para las proteínas de *S. cerevisiae*.

	Subunits	Mass (kD)
RNA polimerasa II	12	515
General transcription factors	26	1560
<u>Mediator</u>	<u>21</u>	<u>1005</u>
Pre-initiation complex	58	3080

La generación de mRNAs maduros por la pol II involucra varios procesos, que ocurren tanto secuencialmente como en paralelo. El ciclo de la transcripción (Figura. i4) involucra la pre-iniciación, iniciación, elongación y terminación.

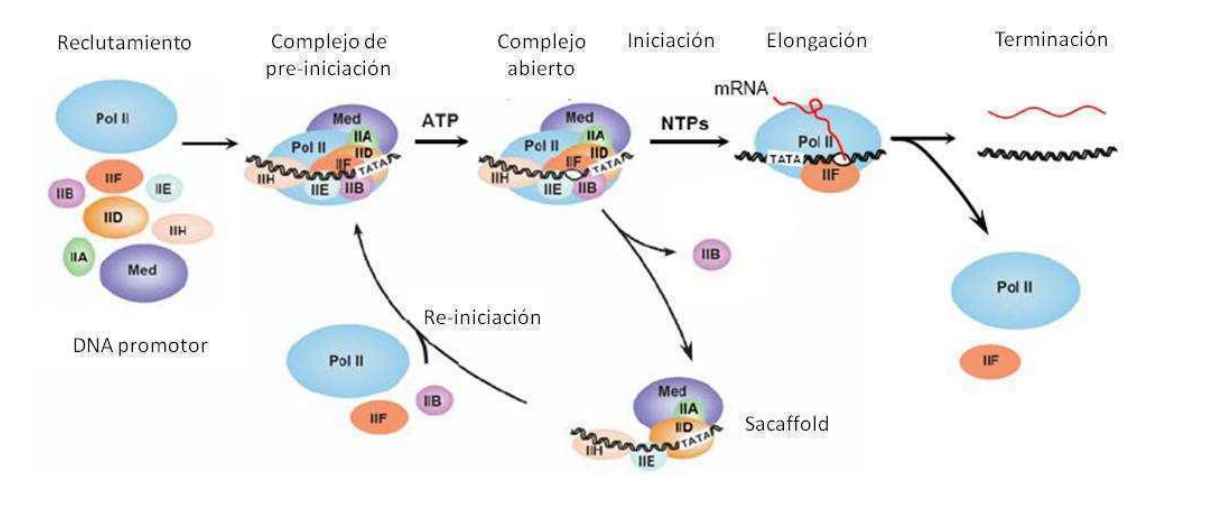


Figura i4. El ciclo de la transcripción. Extraído de (Hahn 2004)

El proceso de transcripción por pol II generalmente comienza gracias a la unión de un factor de transcripción a una secuencia río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Dado que el DNA en una célula eucariota no está desnudo sino formando parte de la cromatina, cuya estructura básica son los nucleosomas (DNA + histonas), el reconocimiento de una secuencia por parte de una proteína de unión a DNA, ya sea un factor de transcripción, la pol II, etc, no es una tarea sencilla. De esta manera, la cromatina, ocluyendo parte de la secuencia del DNA por la interacción entre éste y las histonas, controla el acceso de la maquinaria transcripcional a los genes. Así, el grado de empaquetamiento de la cromatina funciona como otro nivel de control en la expresión génica. Los factores de transcripción deben por lo tanto unirse a la cromatina e inducir su relajación (lo que puede ser visto como el cuento del huevo y la gallina) para permitir que los GTFs y la pol II accedan al promotor (Orphanides y Reinberg 2002). Los factores de transcripción pueden actuar directa o indirectamente sobre la maquinaria transcripcional (en este caso gracias al reclutamiento de factores modificadores de la cromatina). En cualquiera de los dos casos el reclutamiento de la maquinaria transcripcional al promotor es favorecida y el complejo de pre-iniciación (PIC) se ensambla sobre la región *core* o central del promotor (la mínima secuencia de DNA necesaria para especificar transcripción basal o no regulada). El PIC incluye a los GTFs que junto con la pol II y co-factores adicionales determinan la ubicación precisa del sitio de iniciación de la transcripción. Como se comentó, el complejo mediador interactúa con la pol II, en particular con su dominio carboxilo terminal o CTD (*carboxy terminal domain*), siendo esto necesario para la iniciación de transcripción (Hahn 2004). Gracias a la desnaturalización de 11 a 15 pares de bases (pb) del DNA en el sitio de iniciación de la transcripción, la hebra de DNA que actúa como molde es posicionada dentro del sitio activo de la polimerasa dando lugar al complejo abierto o burbuja de transcripción (Wang, Carey et al. 1992) siendo necesario para esto los GTFs TFIIE y TFIIH (Goodrich y Tjian 1994). La iniciación de la transcripción comienza con la formación del primer enlace fosfodiéster al adicionarse los primeros dos nucleósidos trifosfato (NTPs). La presencia de NTPs permite a la polimerasa abandonar el promotor y realizar la transición iniciación-elongación (Dvir, Conaway et al. 1996). Esta transición está caracterizada por el estadio conocido como *clearance* del promotor, en el cual el PIC es parcialmente desmantelado y sólo algunos factores permanecen unidos al él. El complejo que permanece sobre el promotor es conocido como andamio o *scaffold* y es reciclado permitiendo la reiniciación de la transcripción, que es un proceso más rápido que la ronda inicial y es responsable de la mayor parte de la transcripción en la célula (Jiang y Gralla 1993; Orphanides y Reinberg 2000). El paso final del ciclo es la terminación de la transcripción que requiere la disociación de la pol II del DNA. Dos modelos alternativos, que no son necesariamente excluyentes, se han propuesto para explicar el mecanismo de terminación: el modelo alostérico de terminación implica un cambio

conformacional en la pol II después de la transcripción del sitio de poliadenilación (poliA) que la hace susceptible a la terminación (Zhang y Gilmour 2006); el modelo del torpedo involucra a una exonucleasa con actividad 5'-3' que, después del corte 3', degrada al RNA y "persigue" a la pol II llevando eventualmente a su desestabilización y terminación (Connelly y Manley 1988; Proudfoot 1989; Kornblihtt 2004; Luo y Bentley 2004).

## 1.2 El CTD de la RNA polimerasa II

Una característica que distingue a la subunidad mayor (RPB1) de la pol II de otras RNA polimerasas es la presencia de un dominio carboxilo terminal característico (CTD). Este dominio está compuesto por múltiples repeticiones de un heptapéptido con la secuencia consenso YSPTSPS (Figura. i5). El CTD está conservado en eucariotas, aunque el número de repeticiones aumenta con la complejidad genómica del organismo: 26 repeticiones en levaduras, 32 en *C. elegans*, 45 en *Drosophila* y 52 en mamíferos. Interesantemente, el número de repeticiones es relevante para la función de la pol II ya que se necesitan como mínimo 9 repeticiones en levaduras y 28 en células humanas para garantizar la viabilidad celular (Kobor y Greenblatt 2002). La función del CTD, si bien no está del todo clara, no está relacionada con la actividad catalítica de la enzima como fue demostrado tanto *in vitro* (Thompson, Steinberg et al. 1989; Buermeier, Thompson et al. 1992; Kang y Dahmus 1993) como *in vivo* utilizando reporteros transfectados transitoriamente (Gerber, Hagmann et al. 1995). Sin embargo, el CTD sí es necesario para la transcripción de genes en un contexto cromatínico y la ausencia de este dominio conlleva defectos generales en la transcripción (Meininghaus, Chapman et al. 2000). De hecho, lo discutido más arriba acerca del relajamiento de la cromatina en la zona el promotor y del posterior ensamblado de la pol II demuestra que la cromatina es un obstáculo para ésta enzima. Sin embargo, esta situación no es exclusiva del promotor ya que a lo largo de todo el gen la pol II debe enfrentar nucleosomas. Dado que el CTD interactúa con diversos factores, entre ellos algunos relacionados con la elongación a través de los nucleosomas, resulta lógica la necesidad de éste dominio en la transcripción de genes endógenos.

**Figura i5. Secuencia del CTD humano**

Auto-alineamiento de aminoácidos 1593-1979 de la subunidad mayor de la RNA pol II (Número de acceso al GeneBank: NM\_000937). Notar que la serina en la posición 7 del heptapéptido consenso no está conservada en la mitad C-terminal del CTD. Los principales residuos fosforilables, Serinas 2 y 5, se muestran en rojo. Los residuos no conservados se muestran en azul. Extraído de (Palancade y Bensaude 2003)

1	YSPTSPA	19	YSPTSPS	37	YSPTSPE
2	YEPRSPGG	20	YSPTSPS	38	YSPTSPK
3	YTPQSPS	21	YSPTSPS	39	YSPTSPK
4	YSPTSPS	22	YSPTSPN	40	YSPTSPK
5	YSPTSPS	23	YSPTSPN	41	YSPTSPT
6	YSPTSPN	24	YSPTSPS	42	YSPTTPK
7	YSPTSPS	25	YSPTSPS	43	YSPTSPT
8	YSPTSPS	26	YSPTSPN	44	YSPTSPV
9	YSPTSPS	27	YSPTSPN	45	YTPTSPK
10	YSPTSPS	28	YSPTSPS	46	YSPTSPT
11	YSPTSPS	29	YSPTSPS	47	YSPTSPK
12	YSPTSPS	30	YSPTSPS	48	YSPTSPT
13	YSPTSPS	31	YSPSSPR	49	YSPTSPKGST
14	YSPTSPS	32	YTPQSPT	50	YSPTSPG
15	YSPTSPS	33	YTPSSPS	51	YSPTSPT
16	YSPTSPS	34	YSPSSPS	52	YSLTSPAI SPDDSEEN
17	YSPTSPS	35	YSPTSPK		
18	YSPTSPS	36	YTPTSPS		

**Consensus :**  
Y<sub>1</sub> S<sub>2</sub> P<sub>3</sub> T<sub>4</sub> S<sub>5</sub> P<sub>6</sub> S<sub>7</sub>

### 1.3 Algunas modificaciones post-traduccionales del CTD

Como se observa en la figura anterior, 5 de los 7 aminoácidos (aa) presentes en el heptapéptido consenso del CTD pueden ser fosforilados (Y1, S2, T4, S5 y S7) mientras que los dos restantes (P3 y P6) tienen dos conformaciones posibles (*cis* y *trans*) (Meinhart, Kamenski et al. 2005). Se han descrito patrones de fosforilación específicos en los cuales por ejemplo, la fosforilación del residuo serina 5 (S5) se asocia a la iniciación de la transcripción mientras que a la fosforilación de la serina 2 (S2) se la asocia con la etapa de elongación. Se ha detectado también la fosforilación de los residuos Y1, T4 y S7 (Zhang y Corden 1991; Baskaran, Dahmus et al. 1993) (Chapman, Heidemann et al. 2007; Egloff, O'Reilly et al. 2007). Las modificaciones más estudiadas son las mencionadas fosforilaciones en S2 y S5, pero si se toman en cuenta las otras posibles modificaciones y el número de héptadas, la cantidad de estados únicos que se pueden conseguir es realmente grande. Si, sólo a modo de ejemplo, se tienen en cuenta únicamente la fosforilación en S2 y S5 (4 combinaciones posibles en una única héptada) y el estado de isomerización de las dos prolinas (nuevamente 4 son las posibilidades) se obtienen 16 posibles estados. A partir de éste tipo de razonamientos algunos investigadores han propuesto la idea del código del CTD (Buratowski 2003) en el cual, así como en el código genético AUG significa metionina, se cree que un determinado patrón de modificaciones del CTD determina las proteínas que pueden interactuar con él dictando así las propiedades de la maquinaria de expresión. Claro que esto es sólo especulativo y asume varias cosas, como por ejemplo que una héptada es la mínima unidad que puede ser reconocida por una potencial proteína interactuante, que todas las posibilidades matemáticas efectivamente ocurren (de ser así el CTD interactuaría, específicamente, con el proteoma entero), y mucho más importante, que signifiquen

algo. De cualquier manera y en un terreno mucho menos especulativo, el CTD es importante para la expresión de los genes y es capaz de ser modificado post-traduccionalmente. La figura i6 muestra algunas de las quinasas que, *in vitro* o *in vivo*, se ha demostrado que son capaces de fosforilar este dominio. En la mayoría de los casos las consecuencias de estas modificaciones deben ser investigadas en mayor profundidad. Las quinasas mejor estudiadas en cuanto a la fosforilación del CTD son las CDK7, 8 y 9 (Dynlacht 1997; Bregman, Pestell et al. 2000; Murray 2004). Las ciclinas asociadas a estas enzimas no ciclan a lo largo del ciclo celular y son, respectivamente, ciclina H, ciclina C y ciclina T. El complejo CDK7/ciclina H se asocia con la proteína MAT1 y forma el complejo CAK (*CDK-activating kinase*) el cual fosforila otras quinasas involucradas en la regulación del ciclo celular (Harper y Elledge 1998; Kaldis 1999). A su vez el CAK forma parte del GTF TFIIF el cuál fosforila al CTD en S5 (Valay, Simon et al. 1995; Holstege, Jennings et al. 1998; Komarnitsky, Cho et al. 2000; Schroeder, Schwer et al. 2000; Liu, Kung et al. 2004).

Kinase	Associated factor		Complex	Site preference	
	Cyclin	Other partners		Peptides	Phosphopeptides
Cyclin-dependent kinases					
CDK1 ( <i>cdc2</i> )	Cyclin A, B		MPF	Ser 2 Ser 5	H5 H14
CDK2	Cyclin E			Ser 2 Ser 5	ND
CDK7 (MO15) <i>Kin28</i>	Cyclin H <i>Ccl1</i>	MAT1 <i>Tfb3?</i>	TFIIH or CAK	Ser 5	H14 (H5 ?)
CDK8 <i>Srb10</i>	Cyclin C <i>Srb11</i>		Mediator	Ser 5	H14 (H5 ?)
CDK9 (PITALRE)	Cyclin T1, T2, K	7SK snRNA MAQ1 (HEXIM1)	P-TEFb	Ser 5*	H5 (H14 ?)
<i>Ctk1</i> <i>Bur1 (Sgv1)</i>	<i>Ctk2</i> <i>Bur2</i>	<i>Ctk3</i>	CTDK-I	ND ND	H5 H14
Mitogen-activated protein kinases					
ERK 1-2 <i>Mpk1</i>				Ser 5	H14
Others					
DNA-PK		Ku70 Ku86	DNA-PK	Ser 2 Ser 7	ND
c-abl				Tyr 1	ND

**Figura i6. Quinasas del CTD**

Los nombres de las proteínas de mamífero se indican y entre paréntesis se muestran los ortólogos de levadura. Los sitios de fosforilación han sido deducidos por fosforilación *in vitro* de péptidos sintéticos o de fosfo-epítopes generados sobre el CTD. Aunque CDK9 fosforila preferentemente S5 en péptidos, genera fosfo-serina2 *in vivo* e *in vitro* (epítipo H5). Extraído de (Palancade y Bensaude 2003).

El complejo CDK8/ciclina C es parte del gran complejo Mediador y es capaz de fosforilar el CTD (tanto en S2 como en S5) y de responder a distintas vías de señalización (Liu, Ranish et al. 2001; Borggreffe, Davis et al. 2002; Boubé, Joulia et al. 2002; Samuelsen, Baraznenok et al. 2003). Se cree que el complejo CDK8/ciclina C está implicado en la represión de la transcripción por prevenir la formación del PIC (Hengartner, Myer et al. 1998) y por fosforilar la ciclina H impidiendo la acción del



complejo CDK7/ciclina H (Akoulitchev, Chuikov et al. 2000). Por otra parte se han reportado efectos positivos sobre la transcripción mediados por este complejo (Vincent, Kuchin et al. 2001). El par CDK9/ciclina T es el núcleo del factor positivo de la elongación transcripcional P-TEFb (*Positive Transcription Elongation Factor b*) (Price 2000), el cual es regulado negativamente al asociarse con el pequeño RNA 7SK y la proteína HEXIM (Nguyen, Kiss et al. 2001). P-TEFb fosforila tanto al CTD en S2 como al factor DSIF (promoviendo la disociación de éste con el factor negativo de elongación NELF) y promueve así la elongación transcripcional (Marshall, Peng et al. 1996; Wada, Takagi et al. 1998; Yamaguchi, Wada et al. 1998). Por otra parte, P-TEFb es inhibido por los compuestos DRB (5,6-dicloro-furanosilbenzimidazol) y flavopiridol (Sims, Belotserkovskaya et al. 2004) lo que provoca alteraciones en la transcripción (ver más abajo).

Como se discute luego, los distintos procesos involucrados en la expresión génica (transcripción, *capping*, *splicing*, procesamiento del extremo 3') se influyen unos a otros y el CTD está asociado a este acoplamiento (Bentley 2005). Este dominio es capaz de interactuar no sólo con factores involucrados en la transcripción del mRNA sino también con factores de *capping*, *splicing* y poliadenilación (Bentley 2005). En lugar de transportar estos factores a lo largo de todo el ciclo de la transcripción, se cree que el CTD interactúa en forma dinámica con cada uno en el momento "apropiado". Las modificaciones post-traduccionales que afectan el CTD determinan su estructura y posiblemente los factores con los que interactúa (Bienkiewicz, Moon Woody et al. 2000; Buratowski 2003).

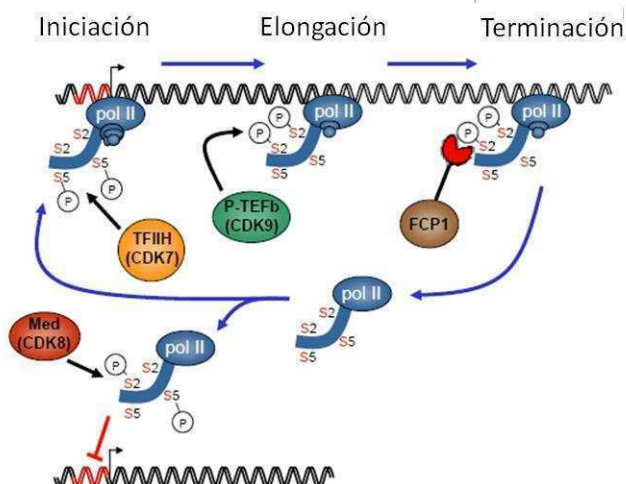


## 1.4 La fosforilación del CTD y la transcripción

Más allá de la gran cantidad de isoformas predichas por modificaciones post-traduccionales del CTD, si se realizan ensayos de *western blot* se detectan dos bandas principales, una correspondiente a formas más fosforiladas que la otra. Las isoformas hipo e hiperfosforiladas (pol II A y pol II O respectivamente) fueron descritas a principios de los '80 (Christmann y Dahmus 1981). Por medio de estudios funcionales y la utilización de anticuerpos específicos para cada isoforma, se demostró que el CTD se encuentra defosforilado durante el ensamblaje del PIC, mientras que durante la transcripción activa se encuentra altamente fosforilado (Christmann y Dahmus 1981; Cadena y Dahmus 1987; Laybourn y Dahmus 1989; Payne, Laybourn et al. 1989; Lu, Flores et al. 1991; Chesnut, Stephens et al. 1992; Auboeuf, Honig et al. 2002). Producto de la acción de quinasas y fosfatasas, el estado del CTD cambia en las distintas etapas del ciclo modulando la actividad de la enzima, permitiendo el reciclado de la pol II y la modulación de la función de la pol II en los procesos de procesamiento del mRNA (Kobor y Greenblatt 2002; Palancade y Bensaude 2003; Sims, Belotserkovskaya et al. 2004). Por medio de anticuerpos que reconocen la pol II fosforilada en S2 o S5 (aunque lamentablemente la especificidad de estos anticuerpos no está del todo aceptada) y utilizando la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP, *chromatin immunoprecipitation*), se demostró que la pol II fosforilada en S5 está asociada con regiones proximales al promotor y que a medida que la pol II se aproxima a la región 3', aumenta la fosforilación en S2 mientras que disminuye la fosforilación en S5 (O'Brien, Hardin et al. 1994; Komarnitsky, Cho et al. 2000; Cheng y Sharp 2003; Gomes, Bjerke et al. 2006). Esto significa que la fosforilación del CTD en S5 correlaciona con la iniciación de la transcripción y elongación temprana (*clearance* del promotor), mientras que la fosforilación en S2 está asociada con la elongación en las regiones codificantes más alejadas del promotor. Por otra parte, la fosfatasa del CTD mejor caracterizada es FCP-1, la cual es globalmente requerida para la correcta expresión génica (Lin, Marshall et al. 2002). FCP-1 defosforila tanto polimerasas en activa transcripción como polimerasas libres (Kong, Kobor et al. 2005). Otras fosfatasas del CTD han sido identificadas y participarían tanto en las distintas etapas de la transcripción como en el reciclado de la pol II (Sims, Belotserkovskaya et al. 2004). Entre ellas, SSU72 y las fosfatasas de CTD pequeñas (SCPs) son fosfatasas específicas de Ser5 (Meinhart, Kamenski et al. 2005). La figura i7 resume algunos de estos conceptos.

**Figura i7. Fosforilación del CTD en el ciclo de transcripción**

En el promotor, marcado en rojo, el CTD es fosforilado en S5 por la subunidad CDK7 de TFIIF. En un paso posterior, pTEFb a través de su subunidad CDK9, fosforila S2 induciendo la transición a elongación. Distintas fosfatasas asisten también la transición a elongación removiendo los fosfatos en S5. Después de la terminación, FCP1 junto con otras fosfatasas permiten el reciclado de la pol II y la reiniciación de la transcripción. El Mediador, a través de su subunidad CDK8 puede inhibir la reiniciación.



### 1.5 La elongación de la pol II y sus etapas

Históricamente el estudio de la transcripción se concentró en las etapas de pre-iniciación e iniciación postergándose el estudio de la elongación. Sin embargo en los últimos años se han hecho descubrimientos sobre factores reguladores de esta etapa así como los efectos que la elongación transcripcional (no sólo la elongación temprana o *clearance* del promotor, sino también la elongación lejos del promotor) puede tener sobre otros mecanismos involucrados en la expresión de un gen e incluso en otros procesos como la reparación del daño al DNA. Más aún, estos trabajos no sólo demostraron que el estudio de la transcripción debe incluir al de la elongación transcripcional, sino que cada vez son más frecuentes los reportes que muestran que en ciertos genes la regulación de la elongación es primordial dado que las polimerasas han abandonado el promotor y se encuentran detenidas dentro del gen a la espera de señales para completar el transcripto. Por último, la importancia de la elongación es confirmada por el hecho de que distintas fallas en factores de elongación son la causa de diversas enfermedades genéticas (Conaway y Conaway 1999).

¿Cómo se define elongación? Cuando se hace referencia a la elongación transcripcional, en general se engloba a dos aspectos fundamentalmente distintos del proceso de elongación por la pol II. Uno es la (velocidad de) elongación, que corresponde a la cantidad de nucleótidos transcriptos por unidad de tiempo, y otro es la procesividad, que corresponde a la cantidad de nucleótidos transcriptos por evento de iniciación o la capacidad de recorrer todo el largo de un gen. Así, la elongación depende del tiempo y la procesividad no. La explicación más simple para la conexión

entre velocidad de elongación y procesividad *in vivo*, es que mientras más tiempo la pol II está en pausa sobre el molde, mayor es la probabilidad de que la misma se disocie de éste, llevando a la producción de transcritos terminados prematuramente. Además se ha demostrado que los complejos elongadores son estables *in vitro*. De esta manera, aunque no es una regla general, los distintos factores que estimulan la elongación también estimulan la procesividad (Mason y Struhl 2005).

Durante la iniciación de la transcripción, la pol II y sus factores auxiliares (GTFs, etc) se ensamblan sobre el promotor y el DNA molde se alinea en el sitio activo de la polimerasa. Éste se define como el lugar dónde los nucleótidos se aparean con el molde y son unidos durante la elongación para producir el transcrito. La elongación transcripcional se divide en tres etapas: escape del promotor (*promoter clearance*), pausado proximal al promotor y elongación productiva (Saunders, Core et al. 2006). La estabilidad que es generada entre la pol II, los GTFs y el DNA necesaria para ubicar a la enzima en el promotor es, justamente, uno de los mayores impedimentos que tiene la pol II para comenzar la transcripción (Hahn 2004) y el PIC debe, por lo tanto, ser desarmado. La hidrólisis de ATP provocada por la DNA helicasa XPB, parte del GTF TFIIH, es necesaria para el remodelamiento del PIC en esta etapa. En el remodelamiento del PIC de 11 a 15 pb del DNA en el sitio de inicio de la transcripción son desenrolladas lo que permite la formación de un complejo abierto que permite al DNA simple cadena entrar en el sitio activo de la pol II (Wang, Carey et al. 1992). En ésta etapa la elongación es altamente inestable y la pol II tiende a liberarse del molde (iniciación abortiva) o a desplazarse lateralmente (*slippage*), lo que implica su disociación y posterior re-asociación río arriba dando como resultado transcritos levemente más largos. Una vez superados los primeros 8 o 9 nucleótidos, tanto la iniciación abortiva como el *slippage* se reducen ampliamente y algunos nucleótidos después es indetectable (Pal y Luse 2003). También en éste estadio inicial la pol II es muy susceptible al pausado y al arresto transcripcional, procesos que a su vez pueden ocurrir en cualquier punto del gen y que son influenciados por secuencias características, distorsiones en la doble hélice como consecuencia del daño al DNA, factores proteicos, características de la cromatina en general o secuencias en el RNA nascente. El pausado se define como un evento en el cual el movimiento 5'-3' de la pol II, y por lo tanto la incorporación de NTPs, se detiene. Superado un cierto tiempo, la pol II reanuda la síntesis del RNA. Las pausas son consideradas un modo natural de regulación de la transcripción debido al gran número de factores capaces de modularlas, entre los cuales podemos citar a TFIIIF, DCIF/NELF, CSB, ELL, etc. Por su parte el arresto transcripcional se define como un bloqueo en la síntesis de RNA que sólo puede ser revertido por medio de factores accesorios como TFIIS. En éste caso el RNA nascente se desprende del sitio activo y la pol II se mueve

en dirección opuesta (*backtracking*). Si es auxiliada apropiadamente unos pocos nucleótidos serán removidos del RNA, gracias a la actividad endorribonucleasa de la pol II, y la transcripción retomará su curso hacia el extremo 3' del gen (Saunders, Core et al. 2006). Se considera que el mecanismo de pausas y arrestos transcripcionales es similar. El mismo implica un leve deslizamiento de la pol II en dirección río arriba del punto de activa incorporación de nucleótidos, *backtracking*, produciendo una pérdida de alineamiento entre el hidroxilo 3' del transcripto nascente y el sitio catalítico de la enzima. Este deslizamiento sería más pronunciado en los arrestos que en las pausas. Aunque las pausas y los arrestos están definidos funcionalmente, no son conceptos absolutos ni mutuamente excluyentes y a menudo se utiliza el término pausa para referirse a cualquiera de estos dos eventos.

El pausado proximal al promotor, a diferencia del *promoter clearance*, fue descrito originalmente en el gen de respuesta a estrés Hsp70 de *D. melanogaster* (Lis 1998). En este gen, la pol II estaba presente en una región proximal al promotor, entre 20 y 40 pb río abajo, comprometida con la transcripción pero en pausa. Este fenómeno era observado en condiciones en las cuales la transcripción del gen no era inducida. Estos descubrimientos mostraron que otros pasos distintos del reclutamiento de la pol II pueden ser blancos de regulación por distintas cascadas de señales. Evidencias recientes muestran que este tipo de regulación está ampliamente distribuido en el genoma (Kim, Barrera et al. 2005). La idea que surge aquí es que el reclutamiento de la pol II y el *clearance* del promotor son eventos lentos e ineficientes como quedó luego demostrado por los trabajos pioneros del grupo de Robert Singer, el cual demostró gracias a la utilización de microscopia de fluorescencia, que de 90 polimerasas que interaccionan con el promotor, sólo una es capaz de elongar activamente (Darzacq, Shav-Tal et al. 2007). De cualquier manera, ya sea en el escape del promotor o en el pausado proximal al promotor, la pol II debe superar la pausa y pasar a la etapa de elongación productiva para completar la transcripción del gen. Para entrar en ésta etapa se necesitan muchos factores que liberan a la pol II pausada y la convierten en una polimerasa activamente elongadora. Como se comentó, los factores DSIF y NELF impiden que la polimerasa abandone la pausa y sus efectos son anulados gracias a la acción P-TEFb, el cual fosforila tanto el CTD como DSIF y NELF. La actividad de TFIIS también es importante para el escape eficiente de la pausa o arresto debido a que éste factor estimula la actividad endorribonucleasa de la pol II favoreciendo el re-alineamiento del sitio activo con el extremo 3' del mensajero nascente (Rudd, Izban et al. 1994; Orlova, Newlands et al. 1995). En cualquier caso, cuando se ha realizado la transición a una pol II activamente elongadora, NELF abandona el complejo transcripcional mientras que DSIF permanece asociado pero juega ahora un rol positivo en la elongación (Hartzog, Wada et al. 1998).

## 1.6 Más sobre factores que afectan la elongación

### TFIIS

Se ha comentado ya que este factor de la elongación promueve la superación de la pausa gracias a promover la actividad endorribonucleasa de la pol II permitiendo así generar un nuevo extremo 3'OH en el sitio activo de la enzima. Este factor fue el primero en ser purificado gracias a su habilidad de promover la síntesis de transcritos largos *in vitro* (Sekimizu, Kobayashi et al. 1976) e interesantemente posee isoformas tejido específicas (Kanai, Kuzuhara et al. 1991; Xu, Nakanishi et al. 1994; Taira, Kubo et al. 1998). Una herramienta importante en el estudio de estos factores es la droga 6-azauracilo (6-AU), la cual se cree dificulta la elongación de la pol II por reducir las concentraciones intracelulares de GTP o UTP. Si bien el gen de TFIIS no es esencial para la viabilidad, levaduras que carecen de TFIIS presentan defectos transcripcionales al ser tratadas con 6-AU (Wind-Rotolo y Reines 2001). Además, y a favor de que TFIIS cumple su rol en la elongación, se observa un comportamiento sinérgico cuando las mutantes de TFIIS se combinan con otras cepas mutantes en otros factores de elongación como DSIF/NELF (Hartzog, Wada et al. 1998). Por otra parte, mientras factores como TBP, TFIIB o subunidades del Mediador son únicamente encontradas (por ChIP) en el promotor, TFIIS es también encontrado en regiones codificantes.

### DSIF-NELF

El mecanismo por el cual DSIF y NELF promueven los arrestos transcripcionales no es conocido con exactitud. Hay evidencias que indican que DSIF interactúa con la pol II activa, que NELF se une al complejo DSIF-pol II y que actúan juntos promoviendo la pausa de la pol II por un mecanismo que involucra interacciones directas con la pol II y el transcrito naciente (Shilatifard, Conaway et al. 2003).

### TFIIF, ELL y Elongin

El hecho de que la tasa de transcripción que se obtiene *in vivo* es mucho mayor que la que se obtiene utilizando pol II purificada, promovió la búsqueda de factores de elongación. Así se han identificado distintas proteínas capaces de promover la elongación *in vitro* como por ejemplo TFIIF, ELL y Elongin. Estas proteínas interactúan directamente con la pol II y disminuyen la tasa con la que la pol II se pausa. Sin embargo el mecanismo exacto de acción se desconoce. Frecuentemente, los experimentos *in vitro* sugieren funciones redundantes para distintos factores de elongación, como es el caso para TFIIF, ELL y Elongin. Sin embargo no siempre se observa lo mismo *in vivo*, lo cual sugiere que posiblemente cada factor estimula la elongación en contextos diferentes y en distintos

puntos dentro del ciclo de la transcripción (Shilatifard, Conaway et al. 2003). Por ejemplo, Elongin-A ha sido asociada a un complejo multi-proteico con actividad de E3 ubiquitina ligasa (Kamura, Burian et al. 2001). En respuesta a la luz UV o al agente cisplatino la pol II es ubiquitinada y degradada en el proteasoma (Bregman, Halaban et al. 1996; Ratner, Balasubramanian et al. 1998). Dado que la elongación de la pol II es bloqueada por la lesión y que la degradación de la pol II facilitaría la reparación de la lesión (ver más abajo), se ha sugerido que el complejo E3 que contiene Elongin-A estaría involucrado en la ubiquitinación de la pol II y su posterior degradación. De cualquier manera, cabe destacar que varios complejos E3 han sido propuestos para esta acción.

### **Elongator y FACT**

A diferencia de los otros factores discutidos hasta aquí, Elongator y FACT no actúan necesariamente sobre la pol II sino que también pueden hacerlo por modificar el entorno cromatínico en el cual ésta se desenvuelve. Los nucleosomas están compuestos por 147 pb de DNA que envuelven a un octámero de histonas formado por un tetrámero H3-H4 y dos dímeros H2A-H2B. Las histonas tienen colas N-terminales que sobresalen del núcleo o *core* del nucleosoma, las cuales son sustrato de enzimas modificadoras que pueden acetilarlas, metilarlas (una, dos y tres veces sobre el mismo residuo, generalmente una lisina), fosforilarlas y ubiquitinarlas. Esto a su vez puede activar (cromatina laxa) o reprimir (cromatina compacta) la expresión génica, y la elongación en particular, dependiendo del tipo, la cantidad y la combinación de modificaciones así como del contexto cromatínico en que se encuentra y por supuesto, dependiendo también de cuál histona (en general la 3 o la 4) es modificada (Saunders, Core et al. 2006). Todas estas modificaciones son reversibles y dinámicas, y le confieren a la cromatina características y propiedades que pueden influenciar la eficiencia y regulación la transcripción. El complejo multi-proteico Elongator, además de interactuar con la forma elongadora de la pol II (pol II O) (Otero, Fellows et al. 1999), posee actividad de histona acetil transferasa (*HAT, histone acetyltransferase*) la cual es capaz de acetilar, modificación normalmente asociada con una cromatina más laxa, residuos lisina tanto de H3 como de H4 (Kim, Lane et al. 2002). FACT fue inicialmente identificado y purificado gracias a su capacidad de promover la elongación en ensayos de transcripción *in vitro* sobre moldes cromatinizados (Short 1987). Distintas evidencias sugieren que FACT se une a los nucleosomas y promueve la remoción de las histonas H2A y H2B, además de actuar junto a P-TEFb en la inhibición de DSIF/NELF (Wada, Orphanides et al. 2000).

### 1.7 La fosforilación del CTD y la elongación transcripcional. El rol de P-TEFb

El requerimiento de la fosforilación del CTD en la elongación de la pol II fue propuesto inicialmente por dos motivos observaciones:

- El CTD de la pol II esta fosforilado cuando la pol II esta elongando.
- Las polimerasas que tienen el CTD hipofosforilado se asocian preferentemente con el complejo de pre-iniciación dónde son fosforiladas durante la iniciación (O'Brien, Hardin et al. 1994).

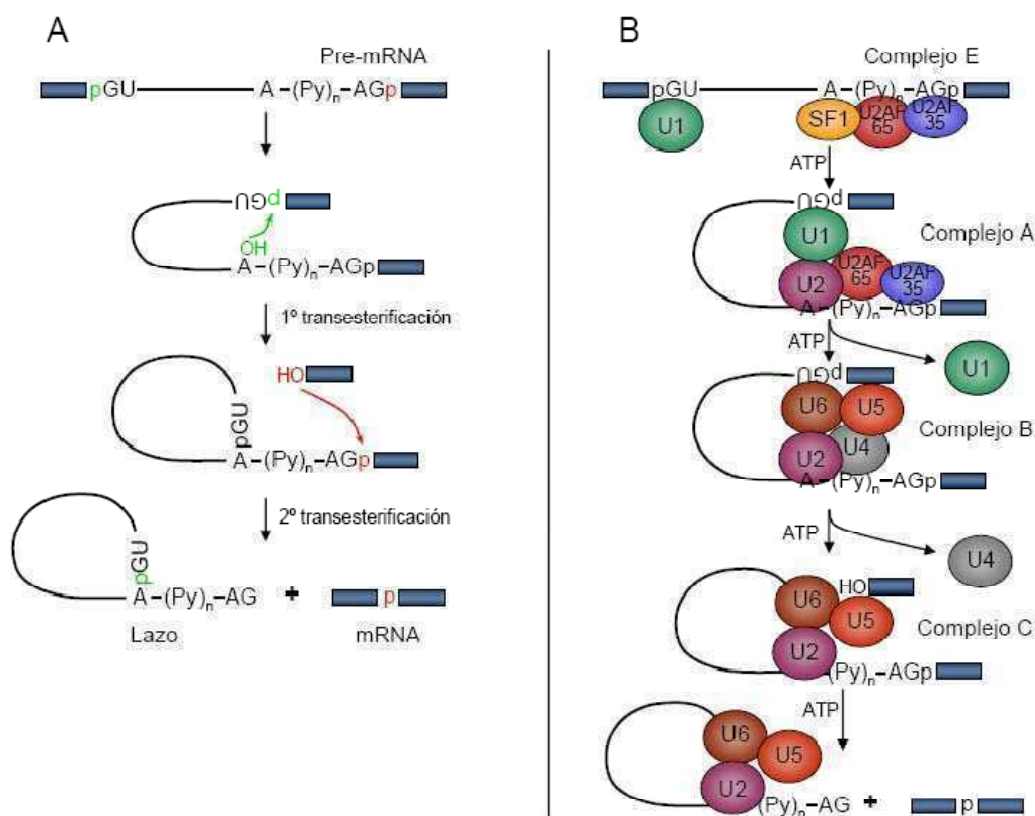
Como se comentó, la fosforilación del CTD ocurre en ambas serinas, la 5 en el promotor y la 2 en el gen, característica de una polimerasa comprometida en la elongación. Además de las pausas características, la pol II también ve impedida su elongación *in vivo* e *in vitro* por un mecanismo exacerbado por el DRB (Marshall y Price 1992). De hecho esto fue confirmado por el grupo del doctor Singer, el cuál utilizando la técnica de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), observó una menor tasa de elongación de la pol II en células tratadas con esta droga (Darzacq, Shav-Tal et al. 2007). Consecuentemente con su rol propuesto en la elongación, P-TEFb no puede prevenir la pausa de polimerasas carentes de CTD (Marshall, Peng et al. 1996). Por último, P-TEFb está ampliamente distribuido en los sitios de transcripción observados en los cromosomas politénicos de *D. melanogaster* pero se re-localiza exclusivamente en genes de respuesta a estrés (*heat shock*) cuando se produce un incremento de la temperatura (Marshall y Price 1995).

## 2. Procesamiento del mRNA. *Splicing*

En 1977 los grupos de Sharp y Roberts-Brooker observaron híbridos del mRNA de la proteína estructural mayor del adenovirus II con su fragmento correspondiente de DNA viral simple cadena. Descubrieron que el mRNA hibridaba en cuatro sitios diferentes del DNA, separados entre sí por bucles de diferentes longitudes y postularon que estos cuatro segmentos (exones), “unidos” en el mRNA maduro, eran el producto de múltiples eventos de corte y empalme (*splicing*) en la maduración de largos mRNAs precursores que incluirían las secuencias complementarias a los bucles de DNA observados (intrones) (Berget, Moore et al. 1977; Chow, Gelin et al. 1977). Gracias a los aportes de innumerables grupos quedó claro que la información presente en los pre-mRNAs eucariotas (mRNA precursor, fiel copia del DNA) es procesada de manera tal que los intrones son removidos y los exones ligados para dar lugar a un mRNA maduro. Esta reacción es llevada a cabo por un complejo macromolecular ribonucleoproteico, el *spliceosoma*, descubierto inicialmente en levaduras (Brody y Abelson 1985). El *spliceosoma* está compuesto por cinco RNAs pequeños nucleares (snRNAs) y un número creciente de factores asociados. Una estimación reciente del número de proteínas que componen al *spliceosoma* asciende a aproximadamente 150 (Zhou, Licklider et al. 2002), entre las cuales se encuentran proteínas involucradas no sólo en la reacción de *splicing* sino también en otros pasos de la expresión génica. La información necesaria para que el *splicing* se lleve a cabo esta presente en el DNA dado que las secuencias de las juntas exón/intrón, presentes en el pre-mRNA y conocidas como “sitios de *splicing*”, dirigen al *spliceosoma* (Black 2003). El sitio de *splicing* 5' (SS-5') marca la junta exón/intrón en el extremo 5' del intrón (Figura i8). Este sitio contiene el dinucleótido GU en el extremo 5' del intrón y el dinucleótido AG en el extremo 3' del exón (no se muestra) además de una secuencia consenso menos conservada (Zhang 1998). En el otro extremo del intrón, la región del sitio 3' de *splicing* (SS-3'), que delimita la junta intrón/exón, posee tres secuencias conservadas: el sitio de ramificación o *branch-point* (BP), un trecho de polipirimidinas (Py) y el dinucleótido AG en extremo 3' del intrón (Zhang 1998). El *spliceosoma* se ensambla sobre estas secuencias y cataliza las dos reacciones de transesterificación que comprende el *splicing* (Figura i8). En la primera transesterificación, el grupo hidroxilo-2' del residuo de adenosina conservado en el *branch-point* ataca al fosfato del sitio de *splicing* 5'. Esto lleva al corte del exón 5' y a la unión concertada del extremo 5' del intrón con el hidroxilo-2' del *branch-point*. Este paso produce dos intermediarios de reacción: un exón 5' libre y un fragmento intrón/exón-3' en una configuración de lazo (*lariat*). En la segunda transesterificación el hidroxilo-3' del exón libre ataca al fosfato en el extremo 3' del intrón produciendo la unión de los dos exones y la liberación del intrón en la forma de lazo. El ensamblaje del *spliceosoma* se realiza a partir de los cinco snRNAs asociados a



factores proteicos formando ribonucleoproteínas pequeñas (snRNPs) y proteínas accesorias (Staley y Guthrie 1998) (Figura i8). El ensamblaje comienza con la asociación del snRNP U1 al sitio 5' de *splicing* a través de apareamiento de bases entre el snRNA U1 y ese sitio. El sitio de *splicing* 3' es reconocido por otro grupo de proteínas.



**Figura i8. El *splicing***

(A) El *splicing* ocurre a través de dos reacciones de transesterificación. En verde, primera transesterificación. En rojo, segunda transesterificación. (B) Ensamblaje del *spliceosoma*. Extraído de la tesis de Manu de la Mata.

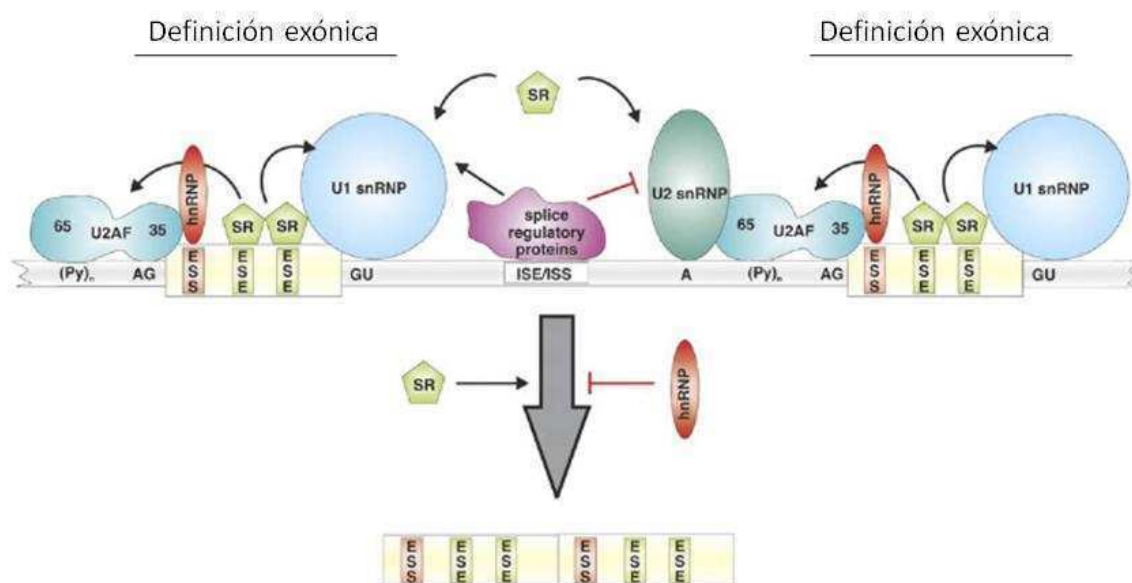
La subunidad de 65 kDa del factor dimérico U2AF (factor auxiliar de U2) se une al trecho de polipirimidinas y, en algunos casos, la subunidad de 35 kDa de U2AF se une al dinucleótido AG en la junta intrón/exón. El primer complejo definido durante el ensamblaje del *spliceosoma* es el complejo E (*early*) que contiene a U1 y U2AF unidos a ambos extremos del intrón (Das, Zhou et al. 2000). La formación de este complejo es el único paso que no requiere gasto de energía en forma de ATP. La formación de todos los complejos subsiguientes requiere la hidrólisis de ATP. Al complejo E

se une luego el snRNP U2, cuyo snRNA, gracias a la complementariedad de bases, se aparea con el *branch-point* originando el complejo A. En un paso posterior, se une un complejo formado por tres snRNPs, U4/U5/U6, dando lugar al complejo B en el cual se pierde el snRNP U1. El complejo B es finalmente rearrreglado dando lugar al complejo C, en el cual la interacción del snRNP U1 con el sitio 5' de *splicing* es reemplazada por el snRNP U6, perdiéndose además el snRNP U4. El complejo C es el que cataliza las dos reacciones de transesterificación (Figura i8).

## 2.1 Arquitectura de un pre-mRNA

Para que los intrones sean removidos y los exones ligados, o bien deben ser reconocidos los intrones, o bien los exones o por qué no, ambos. El mecanismo de *splicing* descrito en la sección anterior, considera al intrón como la unidad reconocida por el *spliceosoma*. En la “definición intrónica” el reconocimiento del segmento a ser removido está regido por los sitios 5' y 3' de *splicing* en un mismo intrón. Esto es la regla en la gran mayoría de eucariotas inferiores como *S. cerevisiae*, en donde los intrones son en general cortos. En vertebrados el panorama es distinto debido a que hay una gran cantidad de exones pequeños, entre 50 y 300 nucleótidos en promedio, separados por intrones mucho más largos, de entre 100 y cientos de miles de nucleótidos (Berget 1995; Black 1995). Además, las secuencias de los sitios 5' y 3' de *splicing* en muchos casos se alejan del consenso por lo que el ensamblado del *spliceosoma* es menos eficiente. Así, en la mayoría de los exones de los vertebrados (Robberson, Cote et al. 1990) no se define el intrón, sino el exón (Figura. i9). La definición exónica (*exon definition*) consiste en el reconocimiento de los sitios 5' y 3' de *splicing* que flanquean a un determinado exón y por lo tanto no están presentes en un mismo intrón. Estos sitios interactúan entre sí estimulando el reclutamiento del *spliceosoma* y consiguientemente el *splicing* (Hoffman y Grabowski 1992). En este proceso participan también una serie de secuencias regulatorias, llamadas *splicing enhancers*, si estimulan positivamente el ensamblado de *spliceosomas*, o *splicing silencers* si lo inhiben. Las secuencias *enhancer* presentes en los exones (*ESEs=Exonic Splicing Enhancers*) promueven el reconocimiento de los mismos y por ende el *splicing* de los intrones lindantes. Se han encontrado además elementos supresores en intrones y exones (*ISSs or ESSs= Intronic or Exonic Splicing silencers*) e inclusive *enhancers* intrónicos (*ISEs= intronic splicing enhancers*). Los *ESEs* funcionan casi exclusivamente como plataforma de unión de proteínas caracterizadas por poseer dominios ricos en arginina y serina (SR), las cuales regulan el *splicing* mediante el reclutamiento del resto de los componentes del *spliceosoma* y la promoción de la interacción entre los mismos (Black 2003). La observación más clara que llevó a proponer el modelo

de definición exónica, fue que mutaciones en sitios de *splicing* 5' de exones internos flanqueados por intrones largos impedían este apareamiento y llevaban a la eliminación del exón junto con sus intrones flanqueantes (*exon skipping*), en lugar de conducir a la retención del intrón en el mRNA maduro (como se esperaría según la definición intrónica). Por otra parte, y dada su ubicación particular, los exones en los extremos de los transcritos tienen mecanismos particulares de definición y promoción de *splicing*, los cuales están asociados a los procesos de *capping* en el extremo 5' y de corte y poliadenilación en el 3' (Ohno, Sakamoto et al. 1987; Lewis, Izaurre et al. 1996; Vagner, Vagner et al. 2000).

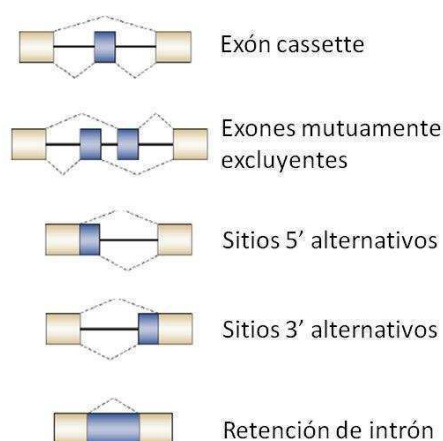


**Figura i9. Arquitectura exón/intrón, definición exónica y factores involucrados**

En la definición exónica, el reconocimiento del exón se da por la interacción de proteínas y ribonucleoproteínas en los sitios 5' de *splicing* (GU) y 3' de *splicing* (AG) a ambos lados del exón. En contraposición, la definición intrónica se da por el reconocimiento de los sitios de *splicing* en un intrón. El reclutamiento de factores es influenciado por proteínas activadoras (proteínas SRs) o inhibidoras (proteínas hnRNPs) las cuales se unen a secuencias presentes en el pre-mRNA como *exonic splicing enhancers* y *silencers* (ESEs y ESSs respectivamente) así como a *intronic splicing enhancers* y *silencers* (ISEs y ISSs respectivamente). Extraído de (Schwerk y Schulze-Osthoff 2005).

## 2.2 *Splicing* alternativo

La definición exónica muestra que debe haber un apareamiento de sitios de *splicing* ya que para que un exón sea incluido en el mensajero maduro dos pasos de reconocimiento son necesarios, involucrando a cuatro sitios de *splicing* y dos *spliceosomas*, mientras que por definición intrónica se requiere un único paso (Fox-Walsh, Dou et al. 2005). Así, el *splicing* en condiciones de definición exónica es menos eficiente que el gobernado por definición intrónica ofreciendo la posibilidad de que ocurra selección diferencial de sitios de *splicing* o *splicing* alternativo (AS). En concordancia con esto último, no sólo hay un mayor porcentaje de *splicing* alternativo en humanos que en *D. melanogaster*, sino también una mayor proporción de exones con una arquitectura del tipo de definición exónica (Figura i2 y (Fox-Walsh, Dou et al. 2005)). Como fue comentado, el AS es el principal mecanismo por el cual la información genética es amplificada permitiendo la síntesis de isoformas de proteínas funcional y estructuralmente distintas a partir de un único gen. Su importancia queda claramente demostrada por descubrimientos que muestran que mutaciones que afectan el AS son frecuentes en enfermedades humanas (Caceres y Kornblihtt 2002; Cartegni, Chew et al. 2002; Pagani y Baralle 2004) o que alteraciones en factores reguladores de este proceso son encontradas en el cáncer (Karni, de Stanchina et al. 2007). Por otra parte distintos tejidos u órganos poseen distintos perfiles globales de AS, de manera similar a lo que ocurre con los patrones de expresión, poniendo de manifiesto la importancia de este proceso (Pan, Shai et al. 2004). Sólo por citar un ejemplo, el AS determina el sexo en *D. melanogaster* ya que el AS de los genes *Sex-lethal* y *transformer* determina la síntesis de proteínas funcionales sólo en hembras, mientras que en machos lleva a la producción de proteínas truncas (Black 2003). La figura i10 describe las distintas maneras por las cuales un evento de *splicing* puede ser alternativo. Entre éstas la más frecuente es el exón cassette y la menos frecuente (siempre en vertebrados) es la retención de intrones.



**Figura i10. Modos de *splicing* alternativo**

Extraído de (Sims, Belotserkovskaya et al. 2004)

Las maquinarias involucradas en el reconocimiento de exones constitutivos o de exones alternativos están íntimamente relacionadas, ya que los componentes esenciales para el *splicing* constitutivo son también requeridos para el *splicing* alternativo (Horowitz y Krainer 1994). La eficiencia con la cual el *spliceosoma* reconoce y selecciona sitios de *splicing* depende del balance entre factores en *cis* y en *trans*. Los factores en *cis*, por ejemplo la secuencia de los sitios de *splicing* y la longitud del exón son, en general, subóptimas en los exones alternativos. En estos casos la inclusión del exón es también regulada por las secuencias auxiliares mencionadas anteriormente como *enhancers* o *silencers*. Cabe aclarar que los exones constitutivos también pueden utilizar secuencias auxiliares para reasegurar su reconocimiento por la maquinaria de *splicing* (McCullough y Berget 1997). Existe un creciente número de casos en donde sitios de *splicing* alternativos están asociados tanto a *enhancers* como a *silencers*, lo que sugiere que es el antagonismo dinámico entre estos lo que regula el *output* de procesamiento de una región alternativa (Smith y Valcarcel 2000). Los factores en *trans*, proteínas reguladoras como por ejemplo SRs o hnRNPs, actúan sobre los elementos en *cis* alterando la eficiencia con la que el *spliceosoma* reconoce un sitio de *splicing*. La presencia de secuencias reguladoras en los pre-mRNAs llamó la atención dado que estas se pueden encontrar en el marco de lectura del mRNA y pone de manifiesto que mutaciones silenciosas a nivel proteico pueden tener consecuencias en el *splicing* (Caceres y Kornblihtt 2002).

### 2.3 Proteínas SRs y hnRNPs

La mayoría de los ESEs se une a algún miembro de la familia de proteínas SR las cuales, en general, promueven la inclusión del exón en cuestión gracias a la interacción con la maquinaria basal del *spliceosoma* (Cartegni, Chew et al. 2002). Las proteínas SR poseen uno o dos motivos de reconocimiento del RNA (RRM) seguidos de un dominio RS que contiene repeticiones del dipéptido arginina-serina. Los RRM determinan la especificidad de unión a los ESEs y el RS participa en las interacciones proteína-proteína que determinan el reclutamiento de la maquinaria de *splicing* y el apareamiento de los sitios de *splicing* (Tacke y Manley 1999). Los distintos estados de fosforilación de las serinas de estos dominios, modulados por distintas vías de señalización, regulan, positiva o negativamente, la actividad de estas proteínas así como su localización (Prasad, Colwill et al. 1999; Blaustein, Pelisch et al. 2005). La familia incluye a SRp20, SRp30c, SRp38, 9G8, SRp40, SRp55, SRp70, SF2/ASF y SC35 (Graveley 2000). Por su parte las proteínas hnRNPs (ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares) deben su nombre que se las asocia con precursores no procesados (hnRNAs, *heterogeneous nuclear RNAs*) y dentro de la familia existen tipos muy diferentes de proteínas, la mayoría de ellas involucradas en la inhibición de la inclusión de exones alternativos

(Krecic y Swanson 1999). El miembro más estudiado, hnRNPA1, se une a *silencers*, tanto ESSs como ISSs, en diversos transcriptos y contrarresta el efecto positivo de SF2/ASF y SC35 en la inclusión de exones alternativos (Mayeda y Krainer 1992; Caceres, Stamm et al. 1994; Hanamura, Caceres et al. 1998). Distintas evidencias sugieren que las proteínas SR actúan mediante distintos factores, aunque las interacciones con los mismos no están del todo claras: pueden estimular la unión de U2AF o U2 a sitios de *splicing* 3' débiles (Lavigne, La Branche et al. 1993; Graveley 2001) reclutar U1 al sitio de *splicing* 5' (Kohtz, Jamison et al. 1994; Wang, Hoffmann et al. 1995) o inhibir el efecto de *hnRNPs* unidas a ESSs o ISSs (Kan y Green 1999). Por su parte, distintos experimentos propusieron mecanismos para el accionar de hnRNPA1, desde interferir directamente en el ensamblado del *spliceosoma* o bloquear las interacciones que promueven la definición exónica hasta inhibir estéricamente la unión de una proteína SR a un *ESE* o *ISE* adyacente (Zhu, Mayeda et al. 2001). En algunos casos los roles de estas proteínas se invierten dado que SRp20 inhibe la inclusión del exón EDI de la fibronectina humana (Cramer, Caceres et al. 1999) y hnRNP H actúa como un activador del *splicing* cuando se une a un ESE en el exón 2 del transcripto Tat del HIV (Caputi y Zahler 2002). Las proteínas SR se almacenan, y probablemente se reciclan y ensamblan, en complejos macromoleculares nucleares conocidos como *speckles* (Lamond y Spector 2003). Dado que, como se verá en la próxima sección, la transcripción y el *splicing* son procesos acoplados, se estudió la relación entre los factores de *splicing* y la maquinaria transcripcional. La hipótesis dominante es que los factores de *splicing* son reclutados desde los *speckles* hacia los sitios de transcripción (Misteli, Caceres et al. 1997) aunque existen pruebas de que algunos genes son reclutados en las vecindades de los *speckles* y sus precursores son transcriptos dentro de estas estructuras, en donde serían procesados (Shopland, Johnson et al. 2003; Moen, Johnson et al. 2004). En este sentido, se ha encontrado a la pol II O y a varios factores de la maquinaria transcripcional entre las proteínas asociadas a los *speckles* (Bregman, Du et al. 1995). Sin embargo, el siguiente punto llama la atención: hay muchos eventos de AS a ser regulados pero pocos reguladores. En este terreno, el cual puede resultar un tanto especulativo, se conocen menos de 50 factores reguladores de AS y menos de 300 proteínas de unión a RNA (Graveley 2009). Independientemente de que es lógico suponer que no todos los factores reguladores del AS (proteínas SR/hnRNPs/otros) hayan sido descritos (revisado en (David y Manley 2008)), se planteó la siguiente pregunta: ¿De qué otras maneras el AS puede ser regulado? Un mecanismo capaz de regular el AS es la transcripción. El acoplamiento entre la transcripción y el AS puede modular este proceso simplemente por alterar las velocidades relativas de síntesis por pol II/reconocimiento por el *spliceosoma* de un sitio de *splicing* (ver más abajo). Otro mecanismo fue propuesto recientemente (Yu, Maroney et al. 2008). En este trabajo los autores muestran que el AS puede ser regulado, independientemente de factores como SRs o hnRNPs, por

secuencias específicas presentes en el mensajero las cuales no alteran la capacidad del snRNP U1 de reconocer un sitio 5' de *splicing*, pero sí alteran la eficiencia con la que el complejo 5'SS/U1 puede comprometerse en una reacción de *splicing* productiva.



## 2.4 Acoplamiento Transcripción-Procesamiento

La complejidad en cada uno de los pasos involucrados en la expresión de un gen ha forzado a los investigadores a estudiar cada uno de estos procesos por separado, desde la transcripción hasta la traducción, pasando por el *capping*, el *splicing*, el procesamiento 3' y la exportación del mRNA al citoplasma. De esta manera se ha obtenido información relevante sobre la expresión de los genes pero en un contexto reduccionista. La figura i11 muestra un resumen de los procesos involucrados en la expresión génica tal cual puede ser encontrada en libros de texto de nivel universitario.

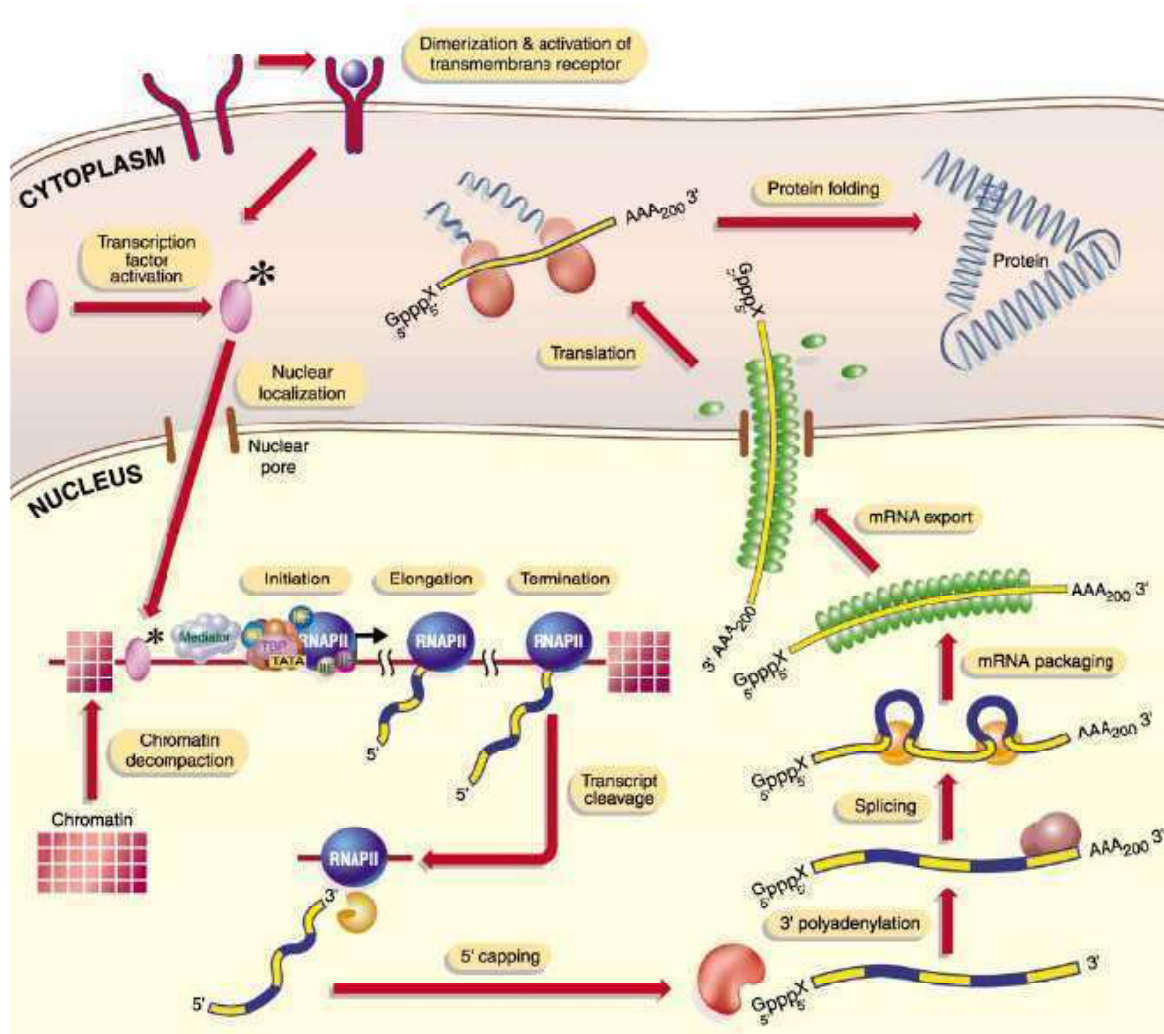
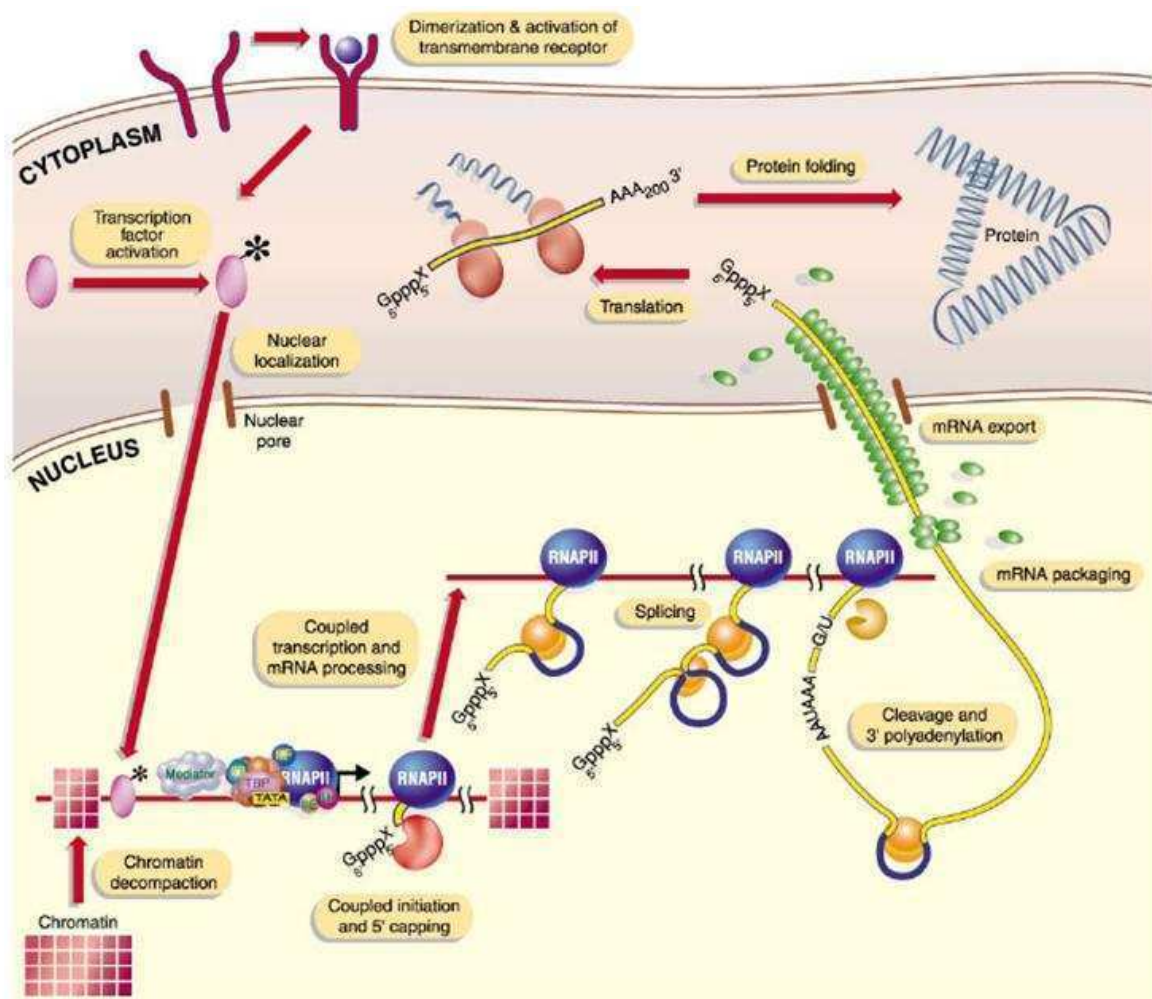


Figura i11. Visión tradicional de la expresión génica

Los diferentes procesos involucrados en la expresión han sido tradicionalmente visto como independientes, donde un proceso debe completarse antes que el siguiente tenga lugar. Extraído de (Orphanides y Reinberg 2002).



Si no se conoce el mecanismo por el cual un mRNA, sólo por citar un ejemplo, es exportado del núcleo al citoplasma, no se podrá estudiar cuál es la interconexión entre la exportación de un mRNA y su traducción. El vasto cuerpo de evidencias sobre los mecanismos que gobiernan la expresión génica obtenido en las últimas décadas ha permitido comenzar el estudio sobre cómo estos procesos se influyen unos a otros para en definitiva, y sumado esto a nuevas interpretaciones de viejos resultados, explicar la manera orquestada por la cual la célula controla la expresión de sus genes (Figura i12). Nos enfocaremos aquí en el acoplamiento entre la transcripción y el procesamiento del pre-mRNA y más específicamente entre la transcripción y el *splicing*.



**Figura i12. Visión contemporánea de la expresión génica**

Los resultados obtenidos en los últimos años sugieren que cada paso de la expresión es una subdivisión de un proceso continuo en el cuál cada etapa está conectada física y funcionalmente con la otra. Extraído de (Orphanides y Reinberg 2002).

Los estudios sobre la estructura de la pol II llevados a cabo por el grupo del Doctor Roger Kornberg, los cuales le valieron la obtención del premio Nóbel de química en 2006, demostraron que el canal de salida del RNA está en íntimo contacto con el dominio CTD (Cramer, Bushnell et al. 2001). Teniendo en cuenta la gran cantidad de proteínas involucradas en el procesamiento del pre-mRNA que demostraron asociación directa o indirecta con la pol II (Hirose y Manley 2000; Das, Yu et al. 2007; Glover-Cutter, Kim et al. 2008), se sentaron así bases estructurales para el acoplamiento entre la transcripción y el procesamiento. En 1997 el grupo del Doctor Bentley publicó un trabajo fundamental en relación al acoplamiento entre la transcripción y el procesamiento. Demostró que la transcripción, el *splicing*, el procesamiento 3' y la terminación de la transcripción eran eventos relacionados entre sí, dado que transcriptos sintetizados por polimerasas carentes del dominio CTD presentaban deficiencias en estos procesos. Se introdujo así el concepto de que en la célula existía una fábrica de mRNAs (*mRNA factory*). También es el caso para el agregado del *cap* en el extremo 5' del pre-mRNA (*capping*). El *capping* ocurre cuando sólo se han sintetizado de 25 a 30 nucleótidos y las enzimas necesarias para esta tarea interactúan con el CTD (McCracken, Fong et al. 1997) y no sólo agregan el *cap* al mensajero, sino que también favorecen el escape del promotor (Mandal, Chu et al. 2004). Este tipo de eventos en los cuales alguna de las etapas de la expresión afecta la transcripción, llamado generalmente acoplamiento recíproco, fueron también observados para el *splicing*. Desde hace muchos años se sabe que la transfección de un plásmido conteniendo un cDNA (DNA copia) permite la transcripción y traducción del inserto en cuestión. Sin embargo se observó que la cantidad de transcripto sintetizado cuando el *splicing* tiene lugar es mayor que la obtenida al utilizar un cDNA, en el cual al no haber intrones no hay *splicing* (Fong y Zhou 2001). La compleja red de interacciones también se extiende a otros procesos como el NMD (*nonsense-mediated decay*), un mecanismo de control de calidad que favorece la degradación de mensajeros con codones de terminación prematuros originados por errores en el *splicing* o introducidos por mutaciones (Cartegni, Chew et al. 2002; Lejeune y Maquat 2005). Por último, la exportación de mensajeros también está acoplada al procesamiento (Maniatis y Reed 2002), y hasta eventos que ocurren a distintos lados de la membrana nuclear como la traducción y el procesamiento están acoplados gracias a las proteínas SR (Sanford, Gray et al. 2004). Cabe aclarar que el hecho de que la transcripción y *splicing* ocurran al mismo tiempo, como puede ser el caso para el gen de la distrofina (Tennyson, Klamut et al. 1995) el cual posee 2.8 Mb y se requieren 16 hs para su síntesis, no necesariamente implica que estos dos procesos están acoplados, sino más bien que son concurrentes (Lazarev y Manley 2007). El acoplamiento implica que un proceso, una etapa en la expresión génica, influencia o afecta a otra etapa de la expresión. De ésta manera, la pol II y su CTD se sitúan en el centro de la escena del acoplamiento no sólo agregando nucleótido a nucleótido en el

pre-mRNA sino también como plataforma dinámica de otras etapas de la expresión génica (Maniatis y Reed 2002; Neugebauer 2002; Proudfoot, Furger et al. 2002; Kornblihtt, de la Mata et al. 2004).

## 2.5 Acoplamiento Transcripción-*Splicing*

Mucho de lo que hoy sabemos sobre el *splicing* fue descubierto utilizando sistemas *in vitro* en los cuales la transcripción y el *splicing* no están asociados. Sin embargo cuando estos mecanismos se disocian el *splicing* es menos eficiente. De hecho el *splicing in vitro* (en ausencia de transcripción) es menos eficiente que el *splicing in vivo* (Wetterberg, Zhao et al. 2001; Bird, Zorio et al. 2004) y también menos eficiente que el *splicing* en sistemas *in vitro* de transcripción y *splicing* simultáneos cuando la transcripción es llevada a cabo por la pol II (Das, Dufu et al. 2006; Hicks, Yang et al. 2006). A continuación se da una breve lista de evidencias que muestran interacción entre las maquinarias de transcripción y *splicing*.

- La pol II, snRNPs e intermediarios de *splicing* co-inmunoprecipitan con anticuerpos dirigidos contra el CTD fosforilado (Chabot, Bisotto et al. 1995; Vincent, Lauriault et al. 1996; Kim, Du et al. 1997).
- La pol II O se asocia a proteínas Sm (componentes de snRNPs) y colocaliza con los *speckles* (regiones nucleares enriquecidas en proteínas SRs) (Mortillaro, Blencowe et al. 1996).
- El procesamiento co-transcripcional requiere que los factores de *splicing* sean reclutados activamente al sitio de transcripción o directamente al transcripto nascente. De hecho, la distribución de los factores de *splicing* está restringida espacialmente y coordinada dentro del núcleo. Esta organización subnuclear de los factores de *splicing* es distorsionada por agentes que bloquean la transcripción (Misteli 2000). Del mismo modo el CTD es requerido para el correcto reclutamiento de factores de *splicing* a los sitios de transcripción (Misteli y Spector 1999). Esto es consistente con hallazgos previos que demuestran que la sobreexpresión en células de péptidos de CTD de tamaño creciente desorganiza la distribución en *speckles* de factores de *splicing* llevando a un patrón más difuso (Du y Warren 1997).
- Pol II O purificada estimula el *splicing in vitro* (Hirose y Manley 2000)
- Factores de *splicing* son reclutados a los transcriptos nacientes y los intrones son removidos co-transcripcionalmente o marcados co-transcripcionalmente para su remoción post-transcripcional (Wetterberg, Zhao et al. 2001).

- Los co-activadores transcripcionales PGC-1 y CA150, además de su rol en transcripción, influyen los patrones de AS (Monsalve, Wu et al. 2000; Pearson, Robinson et al. 2008)
- Distintos factores de *splicing* (snRNPs y proteínas SR) son reclutados co-transcripcionalmente a la pol II, tanto en levaduras (Kotovic, Lockshon et al. 2003; Gornemann, Kotovic et al. 2005; Lacadie y Rosbash 2005) como en células de mamífero (Bentley 2005; Listerman, Sapra et al. 2006; Das, Yu et al. 2007). En éste sentido se ha propuesto (Das, Yu et al. 2007), aunque con cierta controversia (Lazarev y Manley 2007), que las proteínas SR juegan un papel primordial en el acoplamiento entre la transcripción y el *splicing* dado que éstas, junto con el snRNP U1, son reclutados a la polimerasa interactuando con el RNA naciente a medida que este es sintetizado y previniendo la asociación del pre-mRNA con proteínas de la familia de las hnRNPs.

En este sentido hay un detalle no menor: no se trata de acoplamiento entre la transcripción y el *splicing*, sino entre la transcripción por pol II (y con su CTD funcional) y el *splicing*. Distintas evidencias apoyan esto:

- Normalmente sólo en los transcritos de pol II ocurre *splicing*.
- En genes híbridos con promotores de pol III fusionados a genes de pol II ocurre el *splicing* y el procesamiento 3', pero de manera menos eficiente (Sisodia, Sollner-Webb et al. 1987), de manera similar a lo que se observa con promotores de RNA pol T7 (McCracken, Rosonina et al. 1998).
- Al utilizar una pol II carente del dominio CTD, el *splicing* es menos eficiente (McCracken, Fong et al. 1997; Rosonina, Bakowski et al. 2003), aunque esto no es una regla general (Laurencikiene, Kallman et al. 2006).

## 2.6 Transcripción y *splicing* alternativo

### Primeras evidencias: Promotores

A medida que las evidencias del acoplamiento entre la transcripción y el *splicing* se sucedían, surgió la siguiente pregunta: ¿Puede la transcripción influenciar patrones de AS? En 1988 el grupo de Ian Eperon sentó la base para esta pregunta al observar diferencias en el uso de sitios de *splicing* al comparar patrones obtenidos *in vivo* o *in vitro* (gracias a un pre-mRNA sintetizado *in vitro*). Nueve años más tarde, nuestro grupo demostró que la arquitectura del promotor impactaba en los niveles de inclusión del exón alternativo EDI del gen de la fibronectina humana (Cramer, Pesce et al. 1997). El sistema utilizado en nuestro laboratorio involucra la transfección transitoria de células de mamífero con minigenes que poseen el exón alternativo EDI, el cual codifica una repetición facultativa de la fibronectina humana (ver más adelante). El efecto del promotor no era la consecuencia trivial de los diferentes niveles de RNA producidos por cada promotor (fuerza del promotor), sino que dependía de las propiedades cualitativas conferidas por los promotores a la maquinaria de transcripción/*splicing*. Este fenómeno fue más tarde corroborado por otros grupos (Auboeuf et al. 2002; Pagani et al. 2003; Robson-Dixon y García-Blanco 2004). De manera general, estos resultados destacaron el acoplamiento entre la transcripción y el *splicing* y en particular entre la transcripción y el AS. Sin embargo, dado que la mayoría de los genes no tiene promotores alternativos, una manera en la que un mismo promotor podría afectar el *splicing* alternativo *in vivo* sería a través de la ocupación diferencial por factores de transcripción de distinta naturaleza y con distintas propiedades. Así, cada tipo celular o estado fisiológico, podría determinar la ocupación de cada promotor afectando a su vez el *splicing* alternativo. En este sentido, nuestro grupo demostró que distintos activadores transcripcionales dirigidos al promotor afectan el *splicing* alternativo diferencialmente. Activadores clase I (Blau, Xiao et al. 1996), como SW6, Sp1 y CTF/NF1, que estimulan sólo la iniciación de la transcripción, tienen poco efecto sobre la inclusión de EDI. Por otro lado, activadores clase II, como VP16, que estimulan tanto la iniciación como la elongación de la transcripción, disminuyen la inclusión de EDI (Nogués et al. 2002). Algo similar fue descrito por Auboeuf y colaboradores que demostraron que las hormonas esteroides son capaces de afectar el *splicing* alternativo de genes sólo cuando la transcripción es dirigida por promotores sensibles a esteroides (Auboeuf et al. 2002). Asimismo, distintos correguladores de los receptores esteroides afectan diferencialmente al *splicing* alternativo (Auboeuf et al. 2004a; Auboeuf et al. 2004b) lo cual apoya la idea de que la ocupación diferencial del promotor afecta el patrón de *splicing* alternativo resultante. Quedaba clara entonces la hipótesis de que distintos promotores podían reclutar

distintos factores lo que afectaría los patrones de AS. Sin embargo algunos hechos hicieron pensar en la posibilidad de que un mecanismo alternativo operara conjuntamente en el acoplamiento transcripción-*splicing*:

- En primer lugar se sabía que pausas transcripcionales afectaban la competencia de sitios alternativos de poliadenilación y de *splicing* (Roberts, Gooding et al. 1998; Yonaha y Proudfoot 1999).
- Sólo los factores de transcripción con capacidad de estimular la elongación parecían ser capaces de afectar la inclusión de EDI (Nogues, Kadener et al. 2002).
- En el mismo sentido la replicación del molde de DNA, que introduce una estructura cromatínica compacta sobre el molde, aumentaba significativamente la inclusión de EDI (Kadener, Cramer et al. 2001).

Se planteó entonces un modelo cinético de acoplamiento entre la transcripción y *splicing* en el cual la tasa de elongación de la pol II podía afectar el reconocimiento de sitios de *splicing* por el *spliceosoma*.

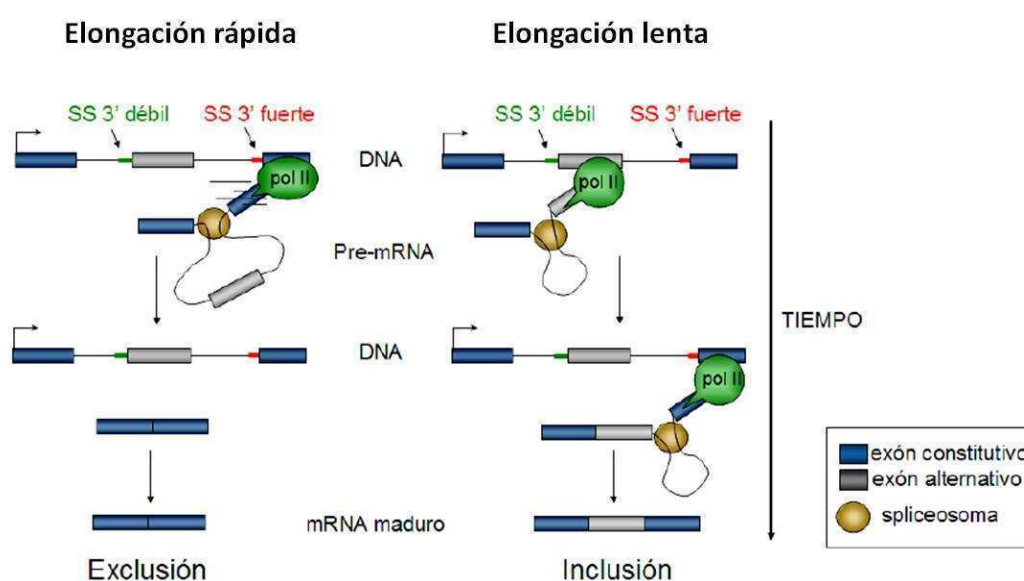
#### **Dos modelos no excluyentes. Reclutamiento y Elongación.**

El *splicing* alternativo implica la existencia de sitios subóptimos los cuales, al ser débilmente reconocidos por el *spliceosoma*, requieren de factores auxiliares. Los diferentes modelos planteados proponen, por lo tanto, distintos factores auxiliares. En el modelo de reclutamiento el factor auxiliar es algún factor de *splicing* el cual fomenta, por ejemplo, la utilización de un sitio. En el modelo cinético el factor auxiliar es el tiempo. Si la pol II elonga lentamente, un sitio débil puede ser reconocido por el *spliceosoma* antes que otro más fuerte y situado río abajo sea sintetizado. Interesantemente los dos modelos, sustentados por evidencias que serán presentadas a continuación, podrían tranquilamente ser uno sólo. Pero nuevamente aparece la necesidad de atomizar para comprender.

El ejemplo más claro de reclutamiento fue presentado por nuestro grupo hace algunos años (de la Mata y Kornblihtt 2006). Sucintamente, este trabajo demuestra que el efecto negativo de SRp20 sobre la inclusión de EDI es gobernado por el CTD ya que el AS de EDI en transcritos sintetizados por polimerasas carentes de éste dominio no era afectado por la presencia o ausencia de ese factor

de *splicing*. Tiempo después se confirmó la presencia de SRp20 en el complejo transcripcional (Das, Yu et al. 2007).

El modelo cinético de acoplamiento entre transcripción y *splicing*, resumido en la figura i13, fue apoyado por nuestro grupo (de la Mata, Alonso et al. 2003) y por otros (Batsche, Yaniv et al. 2006). Para estudiar de manera directa el modelo cinético, utilizamos una polimerasa que, gracias a una mutación puntual, presentaba una menor tasa de elongación (pol II C4). Esta característica fue ampliamente corroborada por distintos experimentos entre los que se destaca la utilización de la técnica de FRAP.



**Figura i13. Modelo cinético de acoplamiento entre transcripción y *splicing***

Una alta tasa de elongación permitiría que los sitios de *splicing*, el débil y el fuerte, sean presentados al mismo tiempo al *spliceosoma*. Dado que el sitio débil es pobremente reconocido como tal, esta situación lleva a la maquinaria a sólo reconocer el sitio fuerte situado río abajo, conllevando la exclusión del exón alternativo. Sin embargo, un sitio es débil o fuerte en relación a otro. Así, si los sitios son presentados de a uno, por una baja tasa de elongación, a la maquinaria de *splicing*, la probabilidad de que sea reconocido aumenta dada la falta de competencia, lo que resulta en la inclusión del exón alternativo.

Consecuente con el modelo presentado en la figura anterior, la transfección transitoria de la polimerasa lenta (C4) provocaba un aumento en la inclusión del exón alternativo EDI. Vale aclarar que las distintas reacciones involucradas en la síntesis del mRNA ocurren con una cinética tal que permite la competencia de sitios (Neugebauer 2002). Considerando un exón con sus intrones flanqueantes de tamaños promedio (150 pb para exones y 3000 pb para intrones), la transcripción y



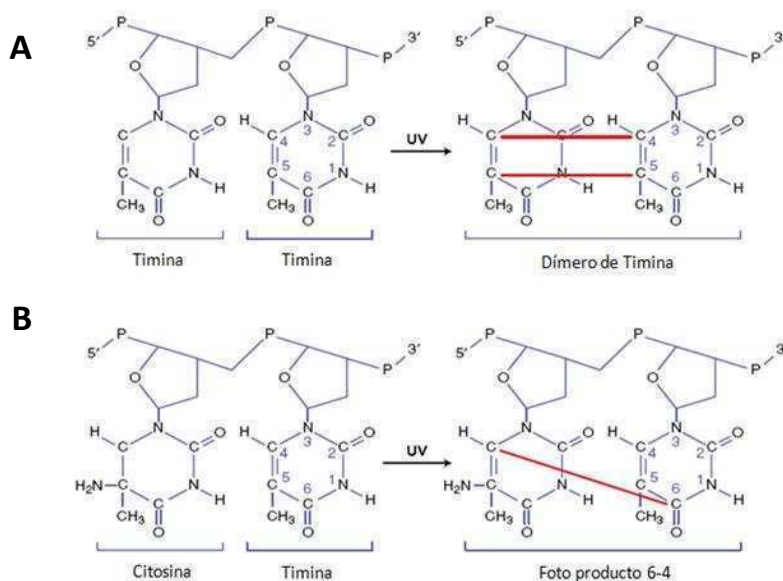
el *splicing* ocurren a velocidades tales que, antes de que el primer sitio pueda ser utilizado, el segundo ha sido ya sintetizado.

Por otro lado, se sabe que la estructura secundaria que adopta el RNA en torno a sitios de *splicing* afecta la disponibilidad de los mismos y por ende la eficiencia del *splicing* (Eperon et al. 1988; Muro et al. 1999). La estructura secundaria puede formarse en una ventana temporal determinada por el tiempo que lleva transcribir las secuencias involucradas, la velocidad de plegamiento de la misma y la velocidad de unión de factores a sitios contenidos dentro de la estructura (Eperon et al. 1988). Estas consideraciones implican que la cinética de las reacciones involucradas en la síntesis de un mRNA determinado dictaría el patrón de *splicing* alternativo resultante. Si se varía la velocidad relativa de alguna de las reacciones, es de esperar que el patrón de *splicing* alternativo sea afectado. Más allá de la ya comentada mutante lenta, en células Hep3B, el AS de EDI es afectado por la droga DRB (Nogues, Kadener et al. 2002) la cual ha demostrado disminuir la tasa de elongación de la pol II. Por otra parte, Batsché y colaboradores encontraron que el complejo remodelador de la cromatina dependiente de ATP, SWI/SNF, influencia los patrones de *splicing* del gen CD44 gracias a la modificación de la tasa de elongación de la pol II. En ausencia de éste factor, la pol II (altamente fosforilada en S2) transcribe el gen con una alta tasa de elongación favoreciendo la utilización de un sitio 3' de *splicing* ubicado río abajo de una de las regiones variables del gen, la cual posee exones alternativos. De esta manera, los exones variables (alternativos) no eran incluidos. Sin embargo, en presencia del complejo SWI/SNF, asociado a la pol II desde la zona promotora, demostraron que la pol II cambiaba su estado de fosforilación en la zona variable (altamente fosforilada en S5) compatible con una menor elongación transcripcional, promoviendo así la inclusión de los exones variables. Como se observa, en este elegante estudio se combinan ambos modelos, el de reclutamiento y el cinético. Sin embargo, el acoplamiento entre transcripción y *splicing* no debe pensarse en términos absolutos, ya que si el *splicing* fuera estrictamente co-transcripcional, es decir si cada intrón fuera eliminado antes de que el intrón siguiente fuera sintetizado, los mecanismos como la definición exónica y el AS no existirían (Kornblihtt, de la Mata et al. 2004).



### 3. El daño al DNA

La importancia del DNA queda de manifiesto, sólo por citar un ejemplo, en que éste polímero no es desechable ni reciclable y debe ser, por lo tanto, reparado al ser dañado. Esto representa una estrategia única en la célula. Todos los otros polímeros celulares, incluyendo el RNA, las proteínas y los polisacáridos, son regularmente reemplazados, o sea degradados y re-sintetizados, gracias a la información contenida en el DNA. Por lo tanto, el mantenimiento de la integridad del DNA es vital para el correcto funcionamiento de las células y el daño al ADN esta inexorablemente asociado al mal funcionamiento celular. Las dramáticas consecuencias clínicas que las mutaciones en el metabolismo del DNA causan son aparentes en enfermedades humanas severas como *xeroderma pigmentosum* o el síndrome *Werner* en las cuales existe, por ejemplo, una alta predisposición al cáncer (Mitchell, Hoeijmakers et al. 2003; Latonen y Laiho 2005). Se ha estimado que únicamente por procesos naturales, como las especies reactivas de oxígeno derivadas de la respiración, más de 20.000 lesiones en el DNA son causadas día a día en una célula (Friedberg, Walker et al. 2006). A esto hay que sumarle las lesiones causadas por agentes del medio ambiente, como pueden ser compuestos presentes en el aire, la comida o radiaciones de distintas longitudes de onda. De esta manera, la célula dispara una gran cantidad de procesos (como cascadas de señalización y vías de reparación) de vital importancia dado que el daño al DNA compromete su presente y futuro (transcripción y replicación respectivamente) y puede causar, por lo tanto, mutaciones, arresto del ciclo celular, senescencia (arresto permanente del ciclo) o muerte celular (Skorski 2002; Ljungman 2005; Hanawalt y Spivak 2008). Debido a su naturaleza aromática, el DNA absorbe la radiación ultravioleta (UV) muy eficientemente y de hecho esta propiedad es utilizada para cuantificar DNA midiendo su absorbancia a 260 nm. El DNA es capaz de absorber eficientemente la luz UV de mayor energía (UVC, 190 a 280nm) pero también absorbe una cantidad significativa de UVB (280 a 315 nm). Los tipos mayoritarios de daño al DNA causado por la luz UV son los dímeros de timina y fotoproductos 6-4 (Figura i14). La droga cisplatino, utilizada en la terapia contra el cáncer, provoca distorsiones en la doble hélice debido a la formación de 1,2-deoxy(guanosina-fosfato-guanosina), 1,2-d(GpG). El UV y el cisplatino, aunque difieren en la naturaleza química de la lesión que causan, producen lesiones que distorsionan la doble hélice (dificultando la replicación y la transcripción (Mitchell, Hoeijmakers et al. 2003)) y son en general reparadas por el mismo mecanismo (*NER*, *nucleotide excision repair*). En relación a esto último, ambas lesiones son señalizadas por la unión al DNA simple cadena de la proteína RPA (*replication protein A*)(Cline y Hanawalt 2003; Hanawalt y Spivak 2008).



**Figura i14. Principalestipos de daño causados por luz UV de alta energía (UVC, 254nm)**

A. dímeros de timina B.  
Fotoproductos 6-4.

### 3.1 Mecanismos de reparación de daño

En mamíferos, las distorsiones al DNA provocadas por la luz UV o por el cisplatino, entre otros agentes, son reparadas por el NER. Éste sistema involucra la acción de más de 20 proteínas cada una con una función específica. La mayoría de las proteínas en los pasos de reconocimiento e incisión de la lesión han sido identificadas y nombradas de acuerdo a siete grupos de complementación de la enfermedad *Xeroderma pigmentosum* (XP, XPA a XPG) una enfermedad en la cual el NER es deficiente. El complejo del NER es ensamblado sobre la lesión y conlleva el desenrollamiento de la doble hélice en la zona de la lesión por una actividad helicasa presente en el factor general de la transcripción TFIIH. La hebra dañada es cortada 15 nucleótidos río arriba y río abajo de la lesión y luego removida. Esto es continuado por síntesis y ligación para sellar el DNA gracias a la acción de endonucleasas, polimerasas y ligasas (Hanawalt y Spivak 2008). Hay dos subtipos, mecánicamente distintos, de NER. El de reparación acoplado a la transcripción (*TCR, transcription coupled repair*) y el de reparación genómica global (*GGR, global genome repair*) (Hanawalt 2002). El TCR ocurre rápidamente, depende de que el gen esté activo y sólo repara la hebra molde para la transcripción. El GGR es más lento y es capaz de reparar ambas hebras así como también regiones que no están siendo transcritas o regiones intergénicas. Como se comentó previamente, la pol II no puede atravesar la lesión y por lo tanto se arresta. No está del todo claro cuáles son los factores de las maquinarias de transcripción y/o reparación que detectan que la pol II ha encontrado una lesión en el DNA y no puede continuar la transcripción del gen. Entre los candidatos a detectar el arresto de la

pol II en la lesión se encuentra la proteína CSB. Esta DNA helicasa interacciona débilmente con la pol II pero es fosforilada en respuesta al daño, posiblemente por ATM-ATR (Matsuoka, Ballif et al. 2007), y se une fuertemente a la polimerasa (Hanawalt 2008). Tal vez esta interacción guíe a la maquinaria de reparación al lugar de la lesión, sin embargo, experimentos *in vitro* no mostraron dependencia de CSB para la detección de la lesión (Sarker, Tsutakawa et al. 2005) siendo éste punto de una gran controversia. En cualquier escenario, cuando la pol II se frena, persistentemente, en la lesión, ésta es reconocida y el sistema de reparación reclutado. También en este punto existe una gran controversia. Mientras era ampliamente aceptado que, para facilitar la reparación, la pol II O que estaba elongando y que fue detenida por la lesión es ubiquitinada y degradada (Muratani y Tansey 2003; Kleiman, Wu-Baer et al. 2005), nuevos reportes muestran que la pol II detenida en la lesión no es degradada, como sí lo es la pol II de la fracción nucleoplásmica (Fousteri, Vermeulen et al. 2006), sino que retrocede y una vez reparada la lesión retoma la síntesis. Aunque tal vez ambos escenarios sean ciertos dependiendo del gen (nuevamente el gen de la distrofina sirve como ejemplo ya que sería sorprendente que habiendo sintetizado la mayoría de las 2,8 Mb retome desde el comienzo) queda claro una vez más el grado de debate en este campo.

### **3.2 La transcripción post-daño**

Al menos desde 1967 se sabe que la cantidad de RNA en estado estacionario disminuye como consecuencia de la irradiación con luz UV (Takeda, Naruse et al. 1967) y otros reportes han confirmado estos resultados (Mayne y Lehmann 1982; Mullenders 1998; Ljungman, Zhang et al. 1999). Cabe destacar que la mayoría de los trabajos que describen lo que ocurre con los niveles de transcripción post-UV analizan cambios en la cantidad de RNA en estado estacionario y pocas veces la degradación o el aumento de estabilidad de un determinado mensajero son tenidos en cuenta, como es el caso del mRNA de c-fos y otros mensajeros de vida media corta (Blattner, Kannouche et al. 2000). En el año 2001 e intentando comprender el escenario de la transcripción post-daño, dos trabajos en el mismo volumen de la revista Nature mostraron que la irradiación de células en cultivo con luz UV provocaba la liberación del pequeño RNA inhibitorio 7SK lo que activaba, por encima de su nivel basal, el complejo P-TEFb (Nguyen, Kiss et al. 2001; Yang, Zhu et al. 2001). A su vez, el tratamiento con UV provoca la hiperfosforilación del CTD lo cual, al menos en parte, depende de la activación de P-TEFb dado que la hiperfosforilación es inhibida por DRB, (Luo, Zheng et al. 2001). Se ha sugerido entonces que la inhibición de la transcripción como consecuencia del daño involucra una inhibición de la iniciación (Rockx, Mason et al. 2000) ya que la pol II A, capaz de interaccionar con el

PIC, está prácticamente ausente dada su conversión en pol II O. Así, un modelo claro y sencillo de la inhibición transcripcional por UV era propuesto. Lo que no se entendía, ni se entiende al día de hoy, es cómo P-TEFb es, supuestamente, capaz de promover la transcripción en ciertas condiciones y de inhibirla en otras (Peterlin y Price 2006). A su vez, resulta también sencillo suponer, como de hecho ocurre, que ciertos genes activen su transcripción en respuesta al daño. Aunque resulte difícil imaginar, con el grado de conocimiento actual, un escenario en el cual ambos hechos coexistan esto es, en definitiva, lo que ocurre. La pol II esta hiperfosforilada y sin embargo hay genes que activan su transcripción, aunque haya sido demostrado que la pol II A es la isoforma capaz de ser recluta al PIC. Entonces, por ejemplo, deberán existir distintos tipos de PIC, algunos capaces de formarse con la pol II A y otros capaces de formarse con la pol II O. De hecho hay reportes de que esta es la situación para el gen dependiente de p53, p21. Si bien la droga doxorubicina no provoca, como el UV, una hiperfosforilación general de la pol II analizada por *western blot*, en respuesta al tratamiento con esta droga se encuentra una mayor proporción de pol II fosforilada en S5 en el promotor y una mayor proporción de pol II fosforilada en S2 dentro del gen (Gomes, Bjerke et al. 2006). Para que quede bien en claro lo poco que entendemos sobre la inhibición/activación y distintos tipos de PICs en condiciones de estrés, el tratamiento con DRB no produce ninguna consecuencia en los niveles de inducción de p21, aunque la fosforilación de S2 esté completamente inhibida. A su vez, para este mismo gen, la fosforilación de S5 sí impacta en los niveles de mRNA de p21, al menos en respuesta a UV (Coin, Oksenysh et al. 2008). Por otra parte, estudios basados en la utilización de *microarrays* demostraron que si bien la disminución en los niveles de mRNA acumulado es más probable que el aumento, en la mayoría de los genes (cerca del 90% ) no se detecta cambio alguno (Gentile, Latonen et al. 2003; Rieger y Chu 2004). Por su puesto hay que mencionar que el tiempo post-UV al que se cosecharon las células y la sensibilidad del *microarray* pueden tener gran impacto sobre este porcentaje.

Todas estas evidencias ponen de manifiesto que el escenario es complejo y que establecer reglas generales puede ser difícil e inapropiado. En cuanto al procesamiento del RNA, ha sido descripto (Kleiman, Wu-Baer et al. 2005) que el procesamiento 3' es inhibido en respuesta al daño con luz UV. Esto ocurre gracias a que en respuesta al daño las proteínas BRCA1 y BARD1 forman un complejo el cuál es capaz de reclutar el factor de poliadenilación CstF50. Como resultado de estas interacciones, el procesamiento 3' se ve inhibido. Por otra parte, la interacción BRCA-BARD da como resultado la formación de una E3 ubiquitina ligasa la cual parece ser responsable (junto a otras E3 propuestas para esta tarea) (Muratani y Tansey 2003) de la ubiquitinación de la pol II y su posterior degradación en el proteasoma que, independientemente de la fracción nuclear en la que ocurra, cromatínica o

nucleoplásmica, puede, *per se*, explicar parte de la inhibición de la transcripción en respuesta al daño.

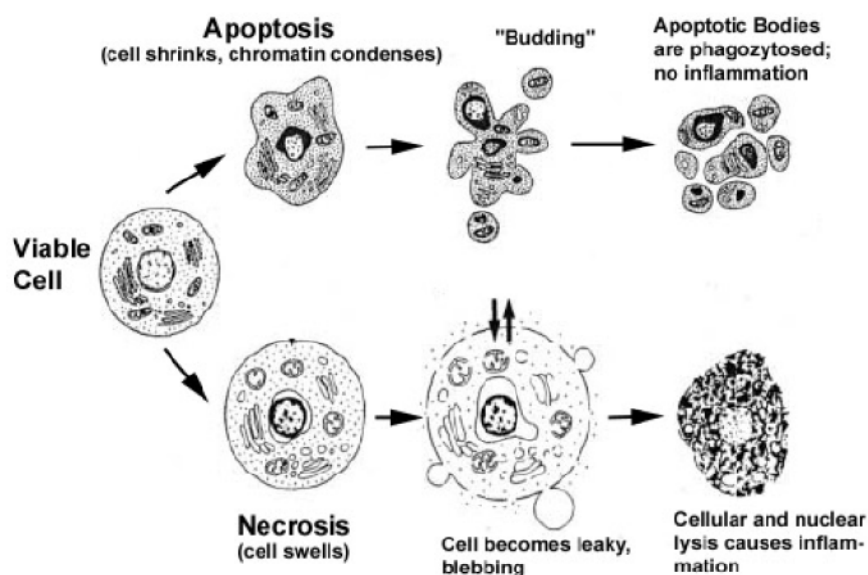
#### 4. Muerte Celular Programada

A mediados del siglo XX varias observaciones habían indicado que la muerte celular juega un importante papel en distintos procesos fisiológicos como la embriogénesis y la metamorfosis (Lockshin y Zakeri 2001). El término “muerte celular programada” fue introducido en 1964 para señalar que la muerte celular durante el desarrollo no era de naturaleza accidental sino que seguía una secuencia controlada que llevaba a la autodestrucción definida tanto en el tiempo como en el espacio. En 1972 Kerr y colaboradores (Kerr, Wyllie et al. 1972) introducen el término de origen griego “apoptosis” (*apo*, lejos, aparte y *ptosis*, caída) para describir el proceso morfológico que llevaba a la autodestrucción basándose en la analogía de hojas cayendo del árbol. Esta analogía enfatiza que la muerte de la materia viva es una parte integral y necesaria del ciclo de vida de los organismos. La muerte celular por apoptosis es un proceso definido y activo que juega un importante papel en el desarrollo de los organismos y en la regulación y mantenimiento de las poblaciones celulares tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Si bien muchas veces los términos muerte celular programada y apoptosis se utilizan indistintamente, y en contraposición a la necrosis o muerte celular no controlada, está claro que no son lo mismo. La muerte celular programada incluye a cualquier tipo de muerte celular controlada. Dentro de este grupo se destacan la apoptosis, el mecanismo de muerte celular programada más estudiado y más común, la autofagia, la piroptosis y la paraptosis (Fink y Cookson 2005). Un ejemplo particularmente instructivo de la apoptosis en el desarrollo animal es la formación los dígitos gracias a la muerte masiva de las células interdigitales en el tejido mesenquimal durante el desarrollo del embrión (Zuzarte-Luis y Hurlle 2002). Otros ejemplos son el desarrollo del cerebro durante el cual la mitad de las neuronas morirán en estadios tardíos del desarrollo (Hutchins y Barger 1998) o el desarrollo de los órganos reproductivos (Meier, Finch et al. 2000). Pero la muerte celular programada y en particular la apoptosis no sólo es de vital importancia en la formación de un organismo adulto sino también en su correcto funcionamiento. La apoptosis está involucrada en la remoción de células no deseadas como por ejemplo aquéllas con mutaciones potencialmente peligrosas o con alteraciones en el control del ciclo celular. La falta de regulación de la apoptosis puede alterar el delicado balance existente entre la proliferación y la muerte celular y puede llevar al cáncer. De hecho en muchos tipos de cáncer distintas proteínas pro-apoptóticas tienen mutaciones que las inactivan o la expresión de proteínas anti-apoptóticas está aumentada lo que conlleva un crecimiento no controlado y la pérdida de habilidad para responder correctamente al estrés, mutaciones peligrosas o daño en el DNA. De hecho la evasión de la apoptosis es una característica de la mayoría, sino de todos, los tipos de cáncer (Fesik 2005). De manera general, la apoptosis está involucrada en el desarrollo, la

diferenciación y la homeostasis de un organismo y en la remoción de células malignas. Así, la falta de regulación de este proceso se relaciona con distintas enfermedades como el cáncer, enfermedades autoinmunes y diseminación de infecciones virales. En contraparte, la apoptosis excesiva se relaciona con enfermedades neurodegenerativas, SIDA y enfermedades isquémicas (Fadeel, Gleiss et al. 1999).

#### 4.1 Apoptosis: Aspectos morfológicos

La apoptosis es un proceso controlado en el cual la célula muere pero de manera ordenada y sin causar inflamación. Algunas de las características de este proceso, en comparación con la necrosis, se muestran en la siguiente figura (Figura i15).



**Figura i15. Características de la apoptosis y la necrosis**

En la apoptosis se observa contracción celular, condensación y marginación de la cromatina en la periferia nuclear y finalmente la formación de cuerpos apoptóticos que contienen organelas, restos de citoplasma y fragmentos nucleares los cuales son fagocitados por células especializadas. En la necrosis la célula se hincha, pierde parte de contenido y finalmente se rompe liberando su contenido al medio lo que provoca inflamación. Adaptado de "Introduction to Apoptosis, ApoReview, Gewies, A. 2003".

Las células apoptóticas pueden ser reconocidas por sus cambios morfológicos: la célula se contrae y pierde contacto con sus vecinas, la cromatina se condensa y se margina en la membrana nuclear, se observan protuberancias de la membrana plasmática (*blebbing o budding*) y finalmente la célula es

fragmentada en estructuras compactas rodeadas de membrana llamadas cuerpos apoptóticos. Estos contienen citoplasma, cromatina condensada, organelas, etc. Los cuerpos apoptóticos son luego fagocitados por macrófagos u otras células fagocíticas y digeridos en los lisosomas. De esta manera los cuerpos apoptóticos son eliminados del tejido en cuestión sin causar inflamación. Estos cambios morfológicos son la consecuencia de eventos moleculares característicos de la célula apoptótica como por ejemplo la activación de un grupo de enzimas proteolíticas conocidas como caspasas. Estas enzimas mediaran, finalmente, la fragmentación del DNA en oligonucleosomas así como también la degradación de una gran variedad de proteínas específicas que usualmente determinan la integridad y la forma del citoplasma y las organelas (Saraste y Pulkki 2000). En cambio en la necrosis, y luego de un estímulo demasiado violento como para orquestar una muerte ordenada, la integridad de la membrana se pierde súbitamente provocando que la célula se hinche y las estructuras internas se rompan. Así, el contenido celular es liberado sin control lo que puede provocar daño a las células vecinas además de una respuesta inflamatoria (Leist y Jaattela 2001).

#### **4.2 Apoptosis: Aspectos moleculares**

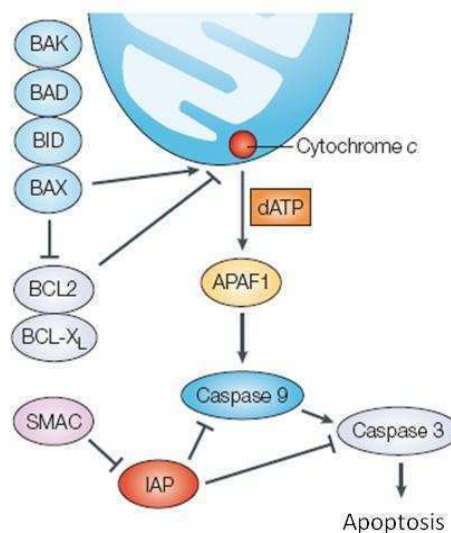
Una de las principales características de la apoptosis es la activación de la familia de proteasas llamadas caspasas (*caspases, cysteine aspartic acid-specific proteases*). Su nombre deriva de la presencia esencial de un residuo cisteína en su sitio activo y del requerimiento de un residuo aspártico en el sustrato. Estas proteasas están normalmente presentes en la célula pero en un estado inactivo (zimógeno, llamado comúnmente pro-caspasa) con poca o nula actividad (Taylor, Cullen et al. 2008). Sin embargo todos los estímulos que promueven apoptosis parecen hacerlo a través de la activación de estas enzimas. Las caspasas poseen en general una subunidad larga, una corta y un pro-dominio ubicado en el extremo amino terminal. Al ser activadas por otras caspasas, el pro-dominio se corta del resto de la enzima así como lo hacen también las subunidades cortas y largas. Este procesamiento permite que la subunidad larga y corta interaccionen entre ellas formando un heterodímero el cual forma el sitio activo. Estudios cristalográficos revelaron que la forma activa consiste en un tetrámero formado por dos heterodímeros iguales y contiene por lo tanto dos sitios activos. Las caspasas pueden dividirse en, al menos, dos grupos. Las caspasas iniciadoras (caspasa 2, 8, 9 y 10) y las caspasas efectoras (caspasa 3, 6 y 7). En general las del primer grupo procesan (cortan) a las del segundo grupo y estas son las encargadas de procesar sustratos específicos relacionados con la muerte celular. Cuando distintas señales del medio interno y/o externo son captadas, las caspasas iniciadoras se activan dando comienzo al proceso apoptótico.



Existen principalmente dos vías de activación de las caspasas iniciadoras: la vía intrínseca y la vía extrínseca.

**Figura i16. Esquema muy simplificado de la vía intrínseca o mitocondrial**

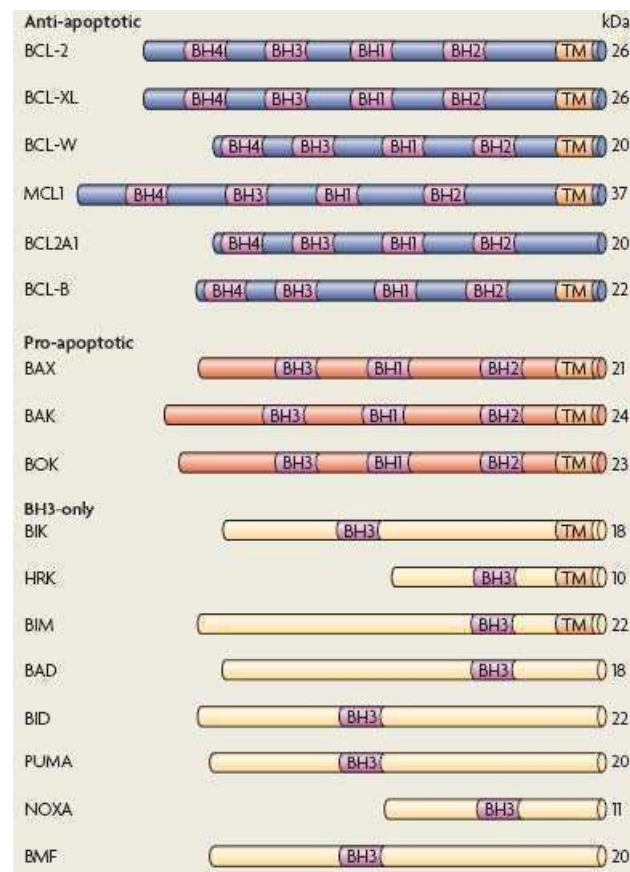
Al recibir las señales de muerte, el citocromo c es liberado del espacio intermembrana de la mitocondria el cual, junto a la proteína APAF1 y a la pro-caspasa 9 forman un complejo llamado apoptosoma (no se muestra) en el cual la pro-caspasa 9 es cortada y por lo tanto activada. La caspasa 9 activa caspasas río abajo, típicamente a la caspasa 3, lo cual conlleva a la apoptosis. Las proteínas Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> inhiben la apoptosis por prevenir la salida del citocromo c de la mitocondria, mientras que las proteínas pro-apoptóticas BAK, BAX, BAD y BID promueven la liberación del citocromo. IAP: *inhibitor of apoptosis*. SMAC: *second mitochondria-derived activator of caspase*. Extraído de (Fesik 2005).



El evento clave en la vía mitocondrial (Figura i16) es la liberación del citocromo c, que provocara la activación de la caspasa 9 la cual a su vez activará a la caspasa 3. Para que el citocromo c sea translocado del espacio intermembrana de la mitocondria al citoplasma, es necesaria la formación de un canal en la membrana externa mitocondrial. Los principales reguladores de la formación del canal, y por lo tanto de la salida del citocromo c, son las proteínas de la familia Bcl-2, en la cual hay miembros pro-apoptóticos (favorecen la formación del canal) y anti-apoptóticos (previenen la formación del canal) (Figura i17). Por otra parte, las proteínas de la familia IAP (*inhibitors of apoptosis proteins*) inhiben la actividad de las caspasas por interacción directa con éstas ya sea uniéndose a su sitio activo o previniendo la heterodimerización. La acción de estas proteínas inhibitorias es contrarrestada por proteínas como SMAC/DIABLO las cuales, así como el citocromo c, son liberadas de la mitocondria e interactúan con las IAPs, liberando a las caspasas y promoviendo por lo tanto la apoptosis (Fesik 2005).

**Figura i17. Familia de proteínas Bcl-2**

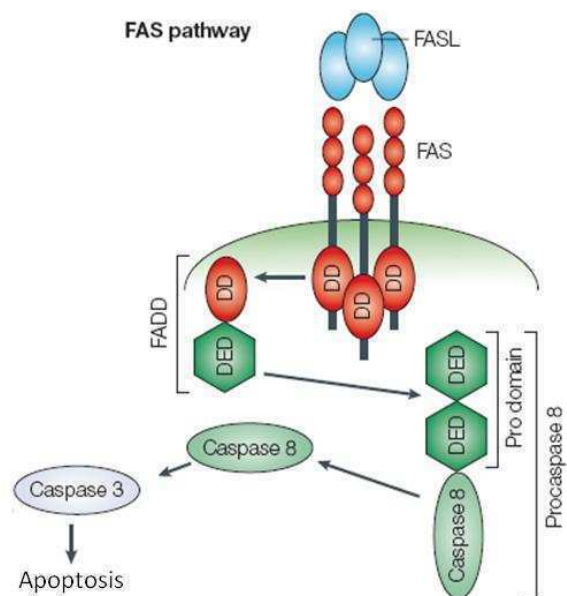
La familia de proteínas Bcl-2 (*B cell lymphoma-2*) reúne reguladores clave de la apoptosis. La sub-familia anti-apoptótica contiene proteínas con cuatro dominios BH (*Bcl-2 homology domain*). La mayoría de estas proteínas tiene además dominios transmembrana (TM). La sub-familia pro-apoptótica está dividida a su vez en dos clases, las que carecen del dominio BH4 (sub-familia BAX) y las que sólo poseen el dominio BH3 (*BH3 only*). En respuesta a un estímulo apoptótico, las proteínas BAX y BAK oligomerizan y promueven la formación del poro y la posterior salida del citocromo. Las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 inhiben la oligomerización de BAX y BAK gracias a la interacción con éstas por sus dominios BH3 y previenen por lo tanto la formación del poro. Por su parte, las proteínas BH3-only favorecen la formación del poro ya sea por inducir directamente la oligomerización de BAX-BAK o por inhibir a las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2. Extraído de (Taylor, Cullen et al. 2008)



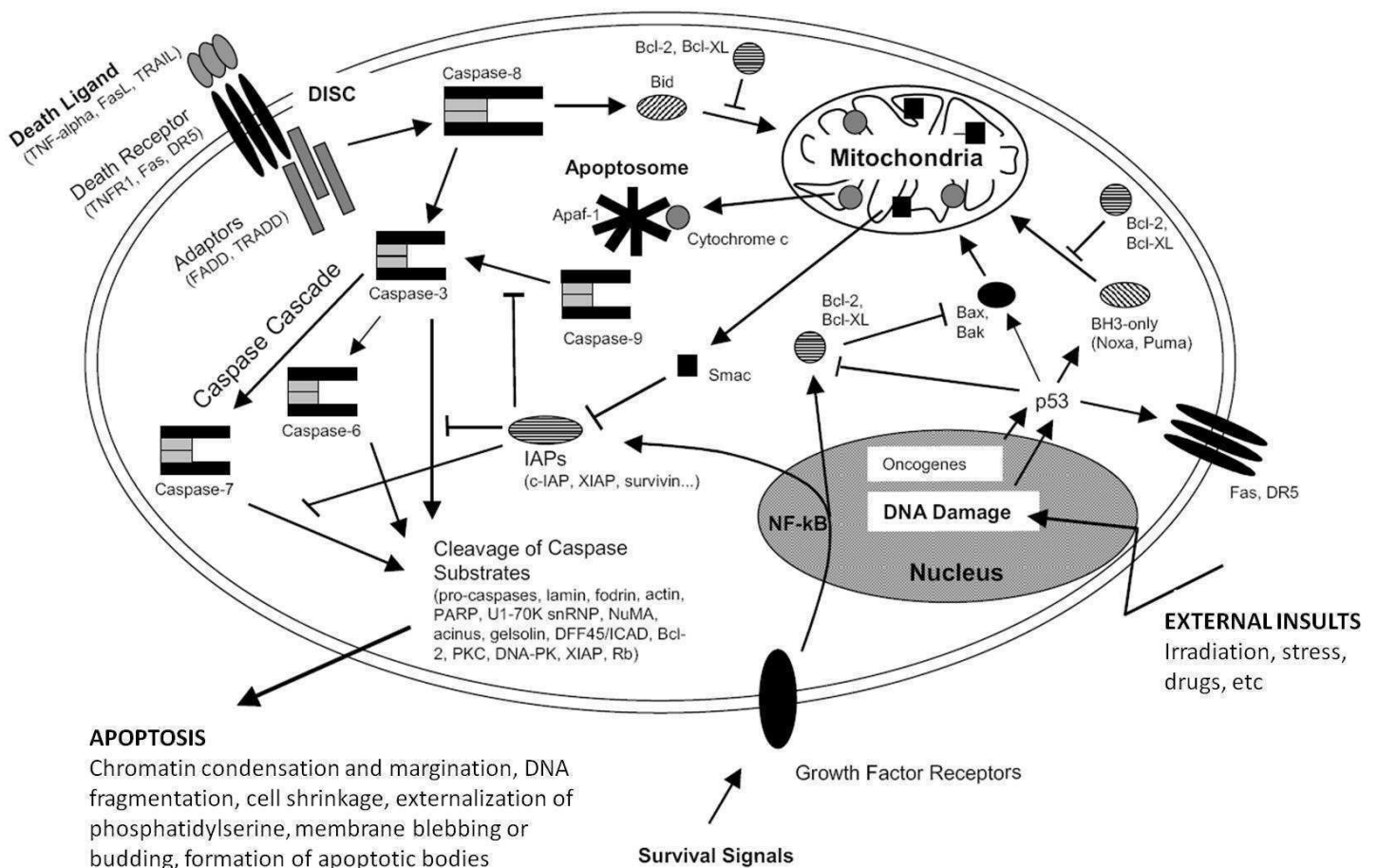
En respuesta a un estímulo apoptótico, como por ejemplo el daño al DNA, el balance de proteínas pro- y anti-apoptóticas es alterado. En una situación de estrés, el factor de transcripción p53 es estabilizado lo que promueve la transcripción de varias de las proteínas hasta aquí descritas como por ejemplo NOXA, PUMA, BID, BAX y APAF-1 entre otras (Vousden y Lu 2002; Efeyan y Serrano 2007). También se ha sugerido que p53 puede inducir la apoptosis independientemente de su actividad transcripcional ya que luego del daño se ha encontrado a p53 en la mitocondria interactuando directamente con proteínas de la familia Bcl-2 (Danial y Korsmeyer 2004). Está claro entonces que en células no estresadas p53 debe estar inactivado. La regulación de este factor se da a muchos niveles, pero la proteína HDM2/MDM2 (en su versión humana o murina) es la principal responsable de la regulación de p53. HDM2 tiene actividad de ubiquitina ligasa y controla la degradación, vía proteasoma, de p53. En respuesta al daño genotóxico, p53 es fosforilado por las quinasas ATM/Chk-2 y ATR/Chk-1 (según el tipo de daño) (Roos y Kaina 2006) lo que impide la interacción entre p53 y HDM2. Esto estabiliza al factor de transcripción el cual transloca al núcleo donde activará la transcripción de los genes mencionados más arriba (Riley, Sontag et al. 2008).

**Figura i18. Esquema muy simplificado de la vía extrínseca**

La vía extrínseca es mediada por los receptores de muerte. Por ejemplo, el FAS ligando (FASL) interactúa con el receptor FAS favoreciendo la interacción entre los dominios de muerte (DD) de FAS con el DD de la proteína adaptadora FADD (*FAS associated dead domain*). El dominio efector de muerte (DED) puede así unirse al DED del pro-dominio de la caspasa 8, lo que dispara la activación de la caspasa. Esta a su vez activa la caspasa efectora 3 y así la respuesta apoptótica. Extraído de (Fesik 2005).



Como se muestra en la figura i18, la inducción de la apoptosis por la vía extrínseca involucra la interacción de ligandos extracelulares (FASL, TNF- $\alpha$ , TRAIL) a sus receptores transmembrana. El receptor FAS, pre-ensamblado como un trímero, cambia su conformación luego de la unión de su ligando y ensambla en su porción intracelular un complejo llamado DISC (*death inducing signaling complex*) compuesto en este caso por éste receptor, la proteína adaptadora FADD y la pro-caspasa-8. El procesamiento, y por lo tanto la activación, de la caspasa 8 en el complejo DISC se cree se debe a la alta concentración local de la pro-caspasa lo que promueve su auto-procesamiento. Las células capaces de inducir esta vía de manera tal de promover la apoptosis son conocidas como células de tipo I. Por el contrario, en las células de tipo II, la señal proveniente de los receptores activados no genera una cascada de señalización de caspasas lo suficientemente fuerte como para inducir la apoptosis. En este caso la señal es amplificada gracias a la vía mitocondrial siendo BID la encargada de conectar ambas vías. BID es fragmentada por la caspasa-8 y la forma procesada de BID (tBID, *truncated BID*) transloca a la mitocondria donde actúa promoviendo la salida del citocromo c como se ha descrito más arriba (Luo, Budihardjo et al. 1998). La figura i19 resume los conceptos presentados hasta aquí.



**Figura i19. Esquema simplificado de las principales vías de señalización en la apoptosis**

La apoptosis puede ser inducida en respuesta a distintas señales, tanto externas (ligandos FAS) como internas (irradiación, drogas etc). Las señales provenientes de los receptores de muerte activan inicialmente a la caspasa-8 presente en el DISC. Se activa así una cascada de señalización que procesa y activa a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 las cuales a su vez procesan distintas proteínas blanco. En algunos sistemas esta cascada de caspasas es suficiente para que se lleve a cabo la apoptosis (células de tipo I) mientras que en otros casos la señal proveniente del DISC debe ser amplificada por la activación proteolítica de BID gracias a la caspasa-8 (células de tipo II). La vía mitocondrial incluye la translocación del citocromo c desde el espacio intermembrana al citoplasma donde promueve la formación del apoptosoma (APAF-1, citocromo c, pro-caspasa-9) gracias a la cual se activa la caspasa-9. Ésta caspasa iniciadora procesa y activa caspasas efectoras como la caspasa-3. La proteína SMAC/DIABLO es otro factor pro-apoptótico liberado de la mitocondria el cual actúa inhibiendo a las proteínas IAP, las cuales inhiben a su vez a las caspasas. La expresión de las IAPs es incrementada en respuesta a señales de supervivencia como aquellas provenientes de los receptores de los factores de crecimiento los cuales activan el factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 como Bcl-2 o Bcl-xL contrarrestan la acción de las proteínas pro-apoptóticas BID, BAX o BAK y pueden por lo tanto inhibir los eventos mitocondriales pro-apoptóticos. Las señales apoptóticas internas tienen frecuentemente su origen en el núcleo, como consecuencia del daño al DNA inducido por la irradiación, drogas o distintos tipos de estrés. El daño al DNA da por resultado, en la mayoría de los casos, la activación del factor de transcripción p53 el cual promueve la expresión de factores pro-apoptóticos de la familia Bcl-2. Adaptado de "Introduction to Apoptosis, ApoReview, Gewies, A. 2003".

Como se ha visto hasta aquí, la mayoría de los estímulos apoptóticos inician la cascada de señalización gracias a la alteración en los niveles de proteínas pro- y anti-apoptóticas inducida por la estabilización del factor de transcripción p53. En este escenario no es sorprendente que este factor se encuentre mutado en más del 50% de los tumores humanos (Hainaut y Hollstein 2000). Sin embargo, aunque pobremente establecidos, existen mecanismos de muerte independientes de este factor. Por ejemplo, la vía extrínseca *per se* es independiente de p53. A su vez la ausencia de este factor ha destacado a otros miembros de la familia p53 como son p63 y p73. Utilizando siRNAs contra p73 o dominantes negativos de ésta proteína se ha demostrado que en ciertas líneas celulares es capaz de promover la apoptosis inducida por distintas drogas utilizadas en el tratamiento del cáncer (Bergamaschi, Gasco et al. 2003; Irwin, Kondo et al. 2003). De manera similar a lo que ocurre para p53, p73 también es fosforilado en respuesta al daño por Chk1-2 controlando así su acumulación (Urist, Tanaka et al. 2004) e induciendo la transcripción de NOXA, PUMA o BAX (Roos y Kaina 2006). De cualquier manera, y más allá de algunas vías de muerte independientes de p53, son claras dos cosas: la importancia de éste factor y la necesidad de investigar en mayor profundidad vías independientes de p53.

Como ha sido comentado, la apoptosis está regulada por múltiples factores como son los niveles de las proteínas pro- y anti-apoptóticas, su localización o sus modificaciones post-traduccionales (Yin 2006). Hace algunos años se ha involucrado al AS en la regulación de la apoptosis como lo sugiere la gran cantidad de genes involucrados en éste proceso que son a su vez afectados por el AS. Más interesante aún es el hecho de que es posible obtener a partir de un mismo gen isoformas pro- o anti-apoptóticas de proteínas pertenecientes a cualquiera de las familias (Bcl-2/caspasa/receptores de muerte) involucradas en las decisiones de vida o muerte de la célula (Schwerk y Schulze-Osthoff 2005). En este sentido, el gen Bcl-x da lugar, por AS, a mensajeros que codifican proteínas con funciones antagónicas, Bcl-xL (anti-apoptótica) y Bcl-xS (pro-apoptótica). La proteína Bcl-xL es la que ha sido mejor descrita hasta ahora siendo ésta capaz de inhibir la acción de los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2. Por su parte la proteína Bcl-xS, la cual carece de 63 aminoácidos presentes en los dominios BH1 y BH2, sensibiliza ciertas líneas celulares a la apoptosis, o bien directamente la induce *per se* (Mercatante, Bortner et al. 2001; Hossini, Eberle et al. 2003) gracias a que puede antagonizar las funciones anti-apoptóticas de Bcl-xL o Bcl-2 (Boise, Gonzalez-Garcia et al. 1993). Por otra parte la expresión de otro regulador central de la apoptosis, como la caspasa-9, también es regulada por AS produciendo mensajeros que codifican para, o bien la proteína hasta aquí mencionada, o bien para una versión más corta la cual carece del dominio catalítico pero

funciona como dominante negativa dado que puede interactuar con APAF-1 en el apoptosoma (Seol y Billiar 1999).

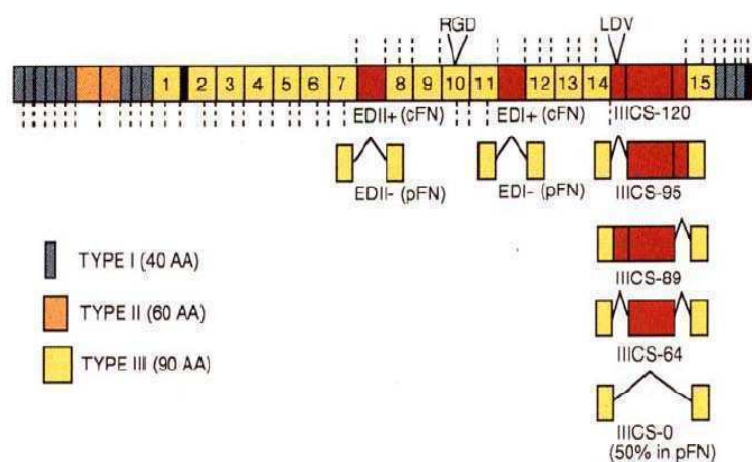
Hasta la fecha, algunos ejemplos de cambios en los patrones de AS en respuesta al daño al DNA inducido, por ejemplo, por la irradiación con luz UV han sido reportados. Se han detectado dominantes negativos de MDM2/HDM2 en respuesta a UV (Chandler, Singh et al. 2006; Dias, Liu et al. 2006), o proteínas con estabilidad diferencial en el gen inducible por p53 PIG3 (Nicholls, Shields et al. 2004). Por su parte, tanto en respuesta a la camptotecina (inhibidor de la topoisomerasa I) como a la irradiación con rayos gamma se han detectado variantes de TAF1 (subunidad de TFIID) en un proceso dependiente de ATM-ATR y Chk1-2 (Katzenberger, Marengo et al. 2006). Lamentablemente estos trabajos han sido descriptivos y no han ahondado en los mecanismos que regulan el AS en respuesta al daño genotóxico. A su vez, algunos ejemplos de cambios en la localización de proteínas reguladoras de AS han sido publicados. Cambios en la localización de hnRNPA1 y hSlu7 (van der Houven van Oordt, Diaz-Meco et al. 2000; Shomron, Alberstein et al. 2005), con el consecuente impacto en los patrones de AS de los reporteros usados en estos trabajos, han sido reportados en respuesta a la irradiación con luz UV. Estos trabajos sugieren que cambios en la localización de proteínas reguladoras de AS pueden ser parte de la respuesta celular al daño.



## 5. Genes estudiados en esta tesis

En la mayor parte de esta tesis se utilizó a la fibronectina (FN), y en particular a su exón alternativo EDI, como modelo de estudio. Independientemente de la fisiología de la FN o del exón EDI, que será brevemente descrita a continuación, la elección de este modelo responde a motivos prácticos. Desde hace más de diez años se trabaja en nuestro laboratorio sobre la regulación del AS de EDI y hemos obtenido evidencias que demuestran que éste exón es regulado tanto por la acción de las proteínas SR como por la tasa de elongación de la pol II. A lo largo de estos años hemos generado distintas herramientas para el estudio de la regulación del AS que fueron utilizadas en este trabajo. Poseemos minigenes reporteros conteniendo al exón EDI (minigenes reporteros de AS) en su versión salvaje o con mutaciones en su sitio 3' de *splicing* (lo que favorece su inclusión), así como mutantes sin señal de poliadenilación y minigenes con promotores constitutivos o inducibles. Es por esto que todo lo que no esté relacionado a la fisiología de la respuesta a la luz UV será analizado utilizando estas herramientas y conocimientos. La FN, glicoproteína de alto peso molecular, está presente en la matriz extracelular (MEC) y ha sido bien caracterizada en el pasado (Kornblihtt, Pesce et al. 1996). Además de localizar en tejido conectivo y lámina basal, la FN está presente a alta concentración en plasma. La FN tiene un rol esencial en adhesión y migración celular en procesos como la embriogénesis, malignidad tumoral, homeostasis, cicatrización de heridas, respuesta inmune y mantenimiento de la integridad de tejidos. Su importancia queda demostrada por el hecho de que ratones *knockout* para la FN son inviables (George, Georges-Labouesse et al. 1993). Existen dos formas mayoritarias de FN: una forma dimérica soluble que es sintetizada en hepatocitos y secretada al torrente sanguíneo (FN plasmática), y una forma dimérica o multimérica sintetizada en fibroblastos, células epiteliales y otros tipos celulares, que es depositada como fibras en la MEC (FN celular). Las dos formas están compuestas por péptidos similares de aproximadamente 250 kDa, que comparten una organización modular común constituida por unidades de 40, 60 y 90 aminoácidos llamadas repeticiones de homología tipo I, II y III respectivamente (Petersen, Thogersen et al. 1983) (Figura i20). El gen de FN abarca 75 kb, contiene 50 exones y es transcrito a partir de un solo promotor. El gen de FN está sujeto a *splicing* alternativo en tres regiones, EDII, EDI y IIICS (Figura i20). El exón EDI (*extra domain I*) codifica una repetición tipo III que, al igual que las demás repeticiones de su tipo, conforma un dominio estructural independiente. La inclusión de EDI es exclusiva de la FN celular, detectada en fibroblastos y ausente en el hígado, el cual produce FN plasmática (Kornblihtt, Vibe-Pedersen et al. 1984). La FN EDI+ es poco abundante en la MEC de adultos y es sobre-expresada en tejidos en alta proliferación tales como el tejido embrionario (Norton y Hynes 1987) y tumores hepáticos malignos (Oyama, Hirohashi et al. 1989). La inclusión de

EDI aumenta en condiciones patológicas específicas como la cicatrización de heridas (Brown, Dubin et al. 1993) y la fibrosis epitelial (Barnes, Hastings et al. 1994). La función de EDI parece estar relacionada fundamentalmente a la cicatrización de heridas. EDI se encuentra aumentado en heridas pulmonares y de piel, con lo cual se cree que puede contribuir a generar una MEC que facilita la cicatrización a través de promover la migración celular (Brown, Dubin et al. 1993). La importancia de EDI fue confirmada a través de ratones *knock-out* para este exón que mostraron deficiencias en la cicatrización de heridas, tiempo de vida más corto que ratones control y deficiencias en la coordinación motora (Muro, Chauhan et al. 2003; Chauhan, Moretti et al. 2005).



**Figura i20. Estructura primaria de la fibronectina y sus variantes de *splicing* alternativo**

El esquema superior representa el polipéptido de mayor longitud posible con sus homologías internas. Se indican los sitios de unión a integrinas: RGD, constitutivo; LDV, alternativo. Las líneas punteadas indican la posición aproximada de los intrones. Las repeticiones de tipo III están numeradas de 1 a 15. La numeración excluye a EDI y EDII. Extraído de (Kornblihtt, Pesce et al. 1996).

Por su parte, al intentar dar un marco fisiológico al estudio del estrés genotóxico y el AS, se analizaron principalmente los genes Bcl-x y C9 cuya vital importancia en la respuesta apoptótica ya fue discutida.



## Objetivos

### Objetivo general

Estudiar el *splicing* alternativo en condiciones de estrés genotóxico.

### Objetivos particulares

#### Capítulo I

Utilizando el exón alternativo EDI, analizaremos el mecanismo por el cual el daño al DNA modula la inclusión de dicho exón.

#### Capítulo II

Utilizando los genes de respuesta a estrés Bcl-x y caspasa 9, analizaremos la relevancia fisiológica del *splicing* alternativo en respuesta al daño genotóxico.

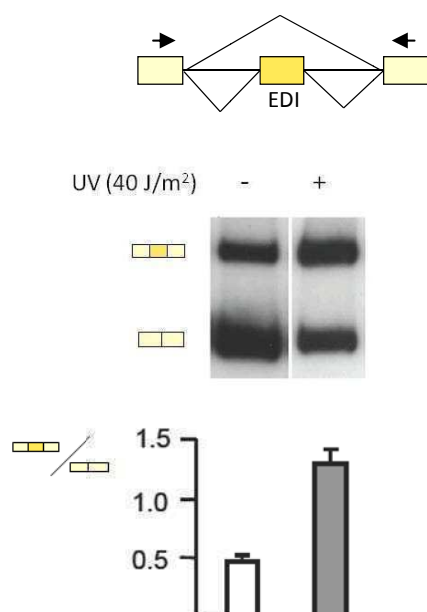
#### Capítulo III

Utilizando *microarrays* analizaremos los cambios globales en los patrones de expresión y de *splicing* alternativo en respuesta al daño en el DNA.

## Capítulo I

### La luz ultravioleta y el *splicing* alternativo del gen de la fibronectina

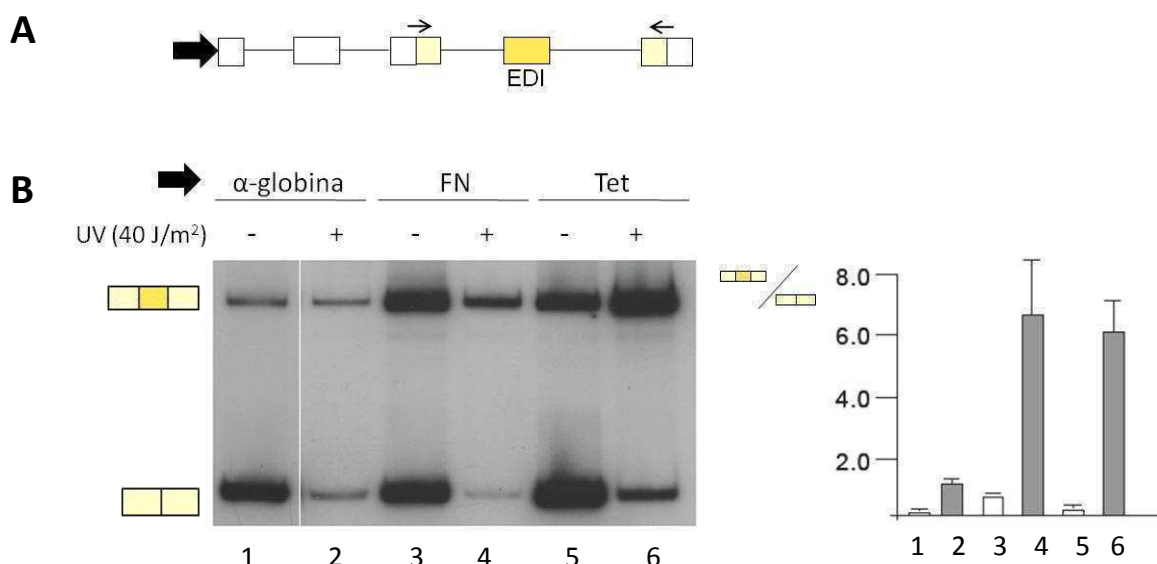
Con el objeto de estudiar si la irradiación con luz ultravioleta provoca cambios en los patrones de AS decidimos, en una primera etapa, hacerlo sobre el gen de la fibronectina humana dado el conocimiento y las herramientas que poseemos en relación a éste. Para ello irradiamos con luz ultravioleta de alta energía (UVC, 254 nm) células Hep3B (línea celular derivada de hepatoma humano), 15 hs más tarde cosechamos las células y, cómo será rutina a lo largo de esta tesis, purificamos el RNA y realizamos una reacción de retro-transcripción seguida de una reacción de PCR radiactiva. Los productos de la reacción de PCR fueron separados en relación a su tamaño mediante una electroforesis en gel nativo de poliacrilamida (ver en Materiales y Métodos “experimento tipo” para más detalles). Como se observa en la figura R1, la proporción de la isoforma que incluye al exón alternativo EDI aumenta en respuesta a la irradiación con luz UV.



**Figura R1. La luz UV afecta la relación inclusión/exclusión del exón EDI del gen de la fibronectina humana**

Células Hep3B fueron irradiadas con luz UV y 15 hs más tarde el RNA fue purificado y utilizado en una reacción de RT-PCR como se detalla en Materiales y Métodos. Las posiciones relativas de los *primers* utilizados en la PCR se muestran con flechas en el diagrama que muestra la zona de interés del gen de la fibronectina. El histograma expresa el promedio  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR de un mínimo de tres experimentos independientes.

Nos preguntamos luego si el cambio en los niveles de inclusión del exón alternativo EDI en respuesta a la irradiación con luz UV podía ser también observado en células transfectadas transitoriamente con minigenes reporteros de AS los cuales en esencia contienen un promotor de la transcripción por pol II, el exón alternativo EDI y sus intrones y exones flanqueantes (ver Materiales y Métodos).



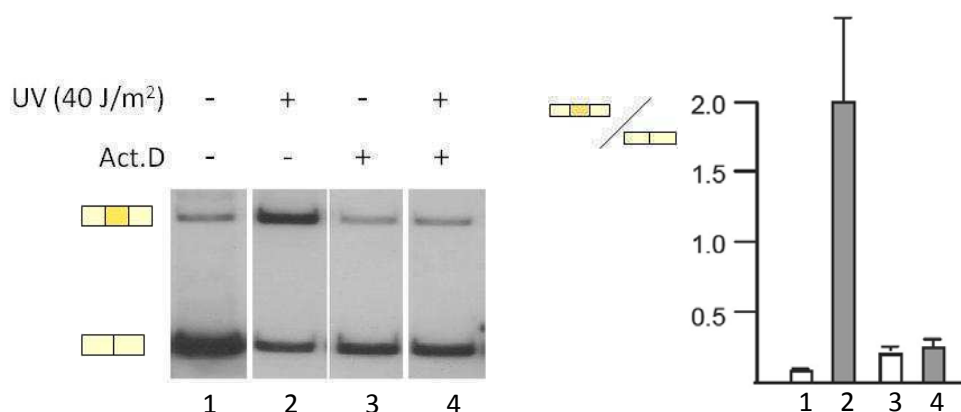
**Figura R2. La luz UV aumenta la relación inclusión/exclusión de EDI utilizando minigenes transfectados transitoriamente**

**A.** Esquema del minigén reportero de AS del exón EDI. Las flechas indican las posiciones de los *primers* utilizados en la PCR. **B.** Células Hep3B fueron transfectadas transitoriamente con minigenes reporteros de AS con distintos promotores:  $\alpha$  globina, fibronectina (FN) o un promotor reprimible por tetraciclina (Tet). Brevemente: para los minigenes con promotores constitutivos  $\alpha$ -globina o FN, inmediatamente finalizada la incubación con los complejos de transfección, las células fueron irradiadas y cosechadas, aproximadamente, 15 hs más tarde. Para el minigén con promotor reprimible por tetraciclina se co-transfectó el minigén junto al activador transcripcional tTA-VP16 en presencia de tetraciclina. Doce horas más tarde la tetraciclina fue lavada para inducir la transcripción e inmediatamente las células fueron irradiadas. Entre 4 y 8 más tarde las células fueron cosechadas. Ver Materiales y Métodos para más detalles. El RNA así obtenido se utilizó en una reacción de RT-PCR. El histograma expresa el promedio  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR de un mínimo de tres experimentos independientes.

Al comparar las calles pares (células tratadas con luz UV) con las impares (células control) se observa, independientemente del promotor utilizado, un aumento en la inclusión de EDI de manera análoga al exón EDI endógeno (Figura R1). El aumento relativo que provoca la luz UV sobre la inclusión de EDI es similar con los tres promotores utilizados y mayor al que se obtiene sobre el exón endógeno. Esto puede deberse a diversos motivos entre los cuales podemos destacar:

- La ausencia de una estructura cromatínica ordenada y/o la ausencia de secuencias distales reguladoras de la transcripción, como es el caso al utilizar plásmidos reporteros de AS, pueden tener impacto sobre la transcripción la cual a su vez puede afectar el AS.
- El mRNA presente en la célula previo a la irradiación. En el caso del exón endógeno hay una determinada cantidad de mensajero de FN el cual persiste luego de la irradiación. Este puede ser luego detectado en la RT-PCR diluyendo así el efecto de la luz UV sobre la inclusión de EDI. Este punto será afectado por distintas variables como por ejemplo la vida media del mensajero en estudio, el cambio en la vida media del mensajero en respuesta a la luz UV, la cantidad absoluta de mensajero previo a la irradiación y la relación en las tasas de transcripción antes y después de la irradiación con luz UV.

El análisis de las figuras R1 y R2 no nos permite concluir que la luz UV esté afectando el proceso de AS debido a que hay dos maneras de obtener un cambio en las relaciones de inclusión y exclusión de, en este caso, el exón EDI: por síntesis (dónde el AS puede actuar) o por degradación, dado que por ejemplo, una mayor tasa de degradación de la isoforma de exclusión arrojaría resultados similares a los obtenidos hasta aquí. Para resolver esta situación se bloqueó la transcripción utilizando la droga actinomicina D (agente que se intercala en el DNA e impide la síntesis del RNA) (Sobell 1985) y luego se irradiaron las células. En este escenario donde sólo pueden degradarse los mRNAs previamente sintetizados, un cambio en los patrones de inclusión/exclusión de EDI indicaría que las tasas de degradación de las dos isoformas no son iguales por lo que el UV estaría actuando, al menos, por la vía de degradación.



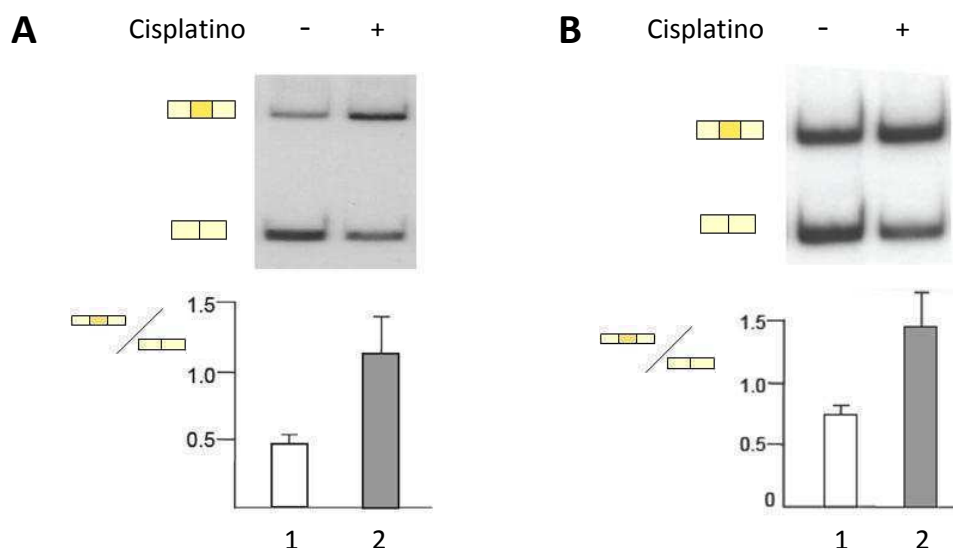
**Figura R3. La luz UV afecta el *splicing* alternativo del exón EDI**

Células Hep3B fueron transfectadas con el minigén reportero  $\alpha$ -globina-EDI. Doce horas más tarde se agregó (calles 3 y 4) actinomicina-D 5 $\mu$ g/ml y luego de una hora de pre-incubación se irradiaron las células (calles 2 y 4) agregándose inmediatamente nuevo medio con o sin droga según se indica. Luego de 15 hs las células fueron cosechadas y las proporciones de inclusión/exclusión de EDI se analizaron como en las figuras anteriores.

Comparando las calles 3 y 4 no se observan diferencias en los niveles de inclusión de EDI, como sí las hay comparando las calles 1 y 2 en las cuales, luego de la irradiación con luz UV, la transcripción puede llevarse a cabo. Resultados similares se obtuvieron para el gen de fibronectina endógena (no se muestra).

**Conclusión #1. La irradiación de células en cultivo con luz UV afecta los patrones de AS del gen endógeno de la fibronectina así como de minigenes reporteros transfectados transitoriamente**

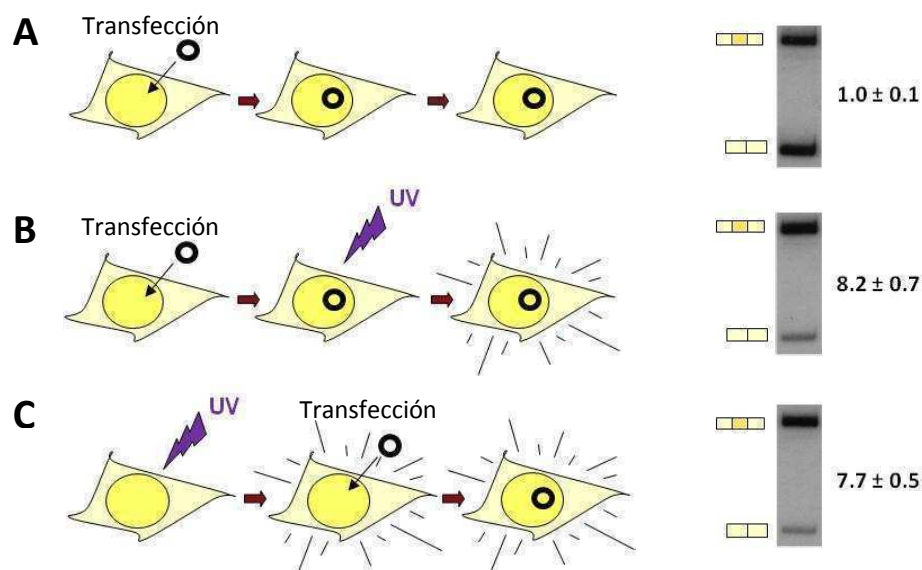
Nos preguntamos en este punto si otro agente genotóxico sería capaz de afectar los patrones de inclusión de EDI con el objeto de obtener una correlación entre el daño al DNA y cambios en AS. Para ello tratamos células con la droga cisplatino la cual, como se ha comentado previamente, también provoca distorsiones en la doble hélice.



**Figura R4. El agente genotóxico cisplatino modifica los patrones de AS del gen endógeno de la fibronectina y de minigenes transfectados transitoriamente**

**A.** Células Hep3B fueron transfectadas con el minigén FN-EDI y tratadas (calle 2) o no (calle 1) con cisplatino (5 µg/ml), el cual fue agregado inmediatamente concluida la transfección. Doce horas más tarde las células fueron cosechadas. **B.** Células Hep3B fueron tratadas con cisplatino (5 µg/ml) y cosechadas 24 horas más tarde. En A y B los niveles de inclusión de EDI se analizaron por RT-PCR radioactiva.

Los resultados hasta aquí obtenidos permiten suponer que el daño al DNA es responsable de los cambios observados en los patrones de inclusión de EDI dado que ambos agentes genotóxicos distorsionan la doble hélice de manera similar, si bien las lesiones específicas que provocan son distintas. Por otra parte, dado que lesiones en el DNA bloquean la elongación de la pol II en *cis*, esto podría provocar cambios en los patrones de AS dado el modelo cinético de acoplamiento. Al analizar la posibilidad de que el daño en *cis* sea necesario para observar cambios en los patrones de AS surgen dos cuestiones a tener en cuenta. Por un lado sería necesario que la lesión represente sólo una pausa para la pol II, ya que si representase un bloqueo (y asumiendo, según fue discutido en la Introducción, que la pol II detenida en la lesión fuese degradada), la pol II no podría continuar la transcripción, ese mRNA no sería transcripto en su totalidad y probablemente sería degradado. Por otra parte, y dado que hasta la fecha no se ha descripto ninguna preferencia de secuencia en la absorción de la luz UV, la posibilidad de que el gen efectivamente irradiado sea aquél que cambie sus patrones de AS resulta, al menos, un tanto caótica. De cualquier manera, para investigar si el daño en *cis* es necesario para observar cambios en los patrones de inclusión de EDI, se transfectaron células con un minigén reportero y luego se las irradió o bien se las irradió en primer lugar y luego se las transfectó. Sólo en el primer caso el minigén reportero puede ser dañado por la luz UV.



**Figura R5. El daño en *cis* no es necesario para modular la inclusión de EDI**

Células Hep3B fueron transfectadas con el minigén reportero FN-EDI e irradiadas con luz UV ( $40 \text{ J/m}^2$ ) después de la transfección (B), antes de la transfección (C) o no irradiadas como control (A). Luego de 15 hs las células fueron cosechadas y las proporciones de inclusión/exclusión de EDI analizadas como en las figuras anteriores.

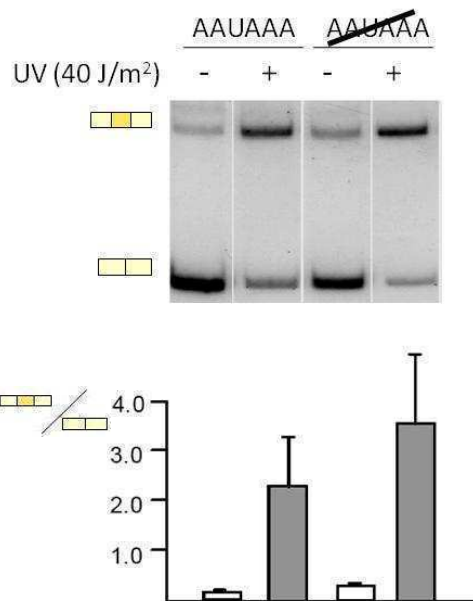
La figura R5 muestra que el orden relativo de transfección-irradiación no modifica el efecto de la luz UV sobre el AS de EDI, por lo que el daño del minigén reportero no es necesario para observar una mayor proporción de inclusión de EDI. En este mismo sentido, la irradiación del plásmido antes de la transfección no provoca cambios en la inclusión de EDI (resultados no mostrados).

## **Conclusión #2. El efecto de la luz UV sobre el AS involucra la propagación de la señal en *trans***

Dado que se había demostrado que el UV inhibe la poliadenilación y que los procesos involucrados en la síntesis de un mRNA maduro se influyen unos a otros, decidimos estudiar si el efecto de la luz UV sobre el AS se debía indirectamente a su efecto sobre el procesamiento del mRNA en su extremo 3'. Para ello construimos, en un primer enfoque experimental, un minigén reportero en el cual deletamos la secuencia de reconocimiento (AAUAAA) de la maquinaria de corte y poliadenilación (Figura R6).

**A**

	AAUAAA	<del>AAUAAA</del>
mRNA total	100±30	5±3
% mRNA poly (A)+	85±25	17±7

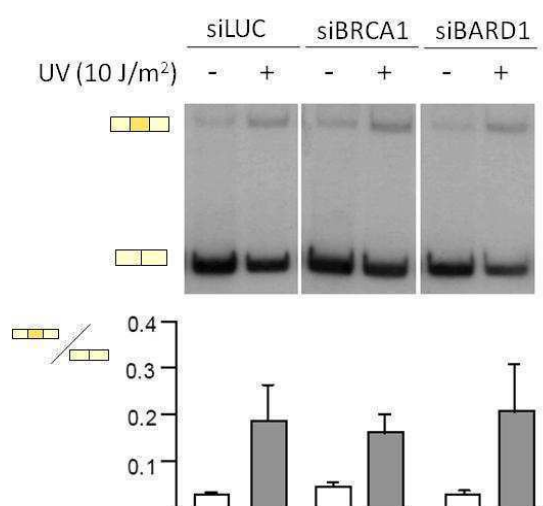
**B**

**Figura R6: El procesamiento 3' no es responsable del efecto de UV sobre el AS de EDI**

**A.** Células Hep3B fueron transfectadas con el minigén Tet-EDI con su secuencia de corte y poliadenilación salvaje (AAUAAA) o con un minigén Tet-EDI sin secuencia de corte y poliadenilación (~~AAUAAA~~). La cantidad de mRNA total y poliadenilado obtenido a partir de cada construcción fue analizada purificando el mRNA poli(A)+ utilizando una columna de poli(T) (*polyATract mRNA Isolation system*, Promega). **B.** Células Hep3B fueron transfectadas con las construcciones analizadas en "A" e irradiadas con UV. Los niveles de inclusión de EDI se analizaron por RT-PCR radioactiva. El histograma expresa el promedio  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR de dos experimentos independientes.

La figura R6.A muestra que el minigén mutado en su señal de poliadenilación posee una menor cantidad de mRNA total debido, probablemente, a que la cola de poliA está relacionada a la estabilidad de los mensajeros. Por otra parte confirmamos la inhibición de la poliadenilación en respuesta a UV (25% de inhibición). A su vez, el efecto relativo de la luz UV sobre ambos minigenes es similar, lo que nos permite concluir que el procesamiento 3' no está involucrado en el efecto de la luz UV sobre el AS. Para confirmar esta conclusión, se diseñaron *siRNAs* (*small interfering RNAs*) específicos contra los mensajeros codificantes para las proteínas BRCA-1 y BARD-1. Éstas han sido previamente descritas como las responsables de la inhibición del procesamiento 3' en respuesta a la luz UV debido a su interacción con la proteína CstF-50.





**Figura R7: Las proteínas BRCA-1 y BARD-1 no están involucradas en el efecto de la luz UV**

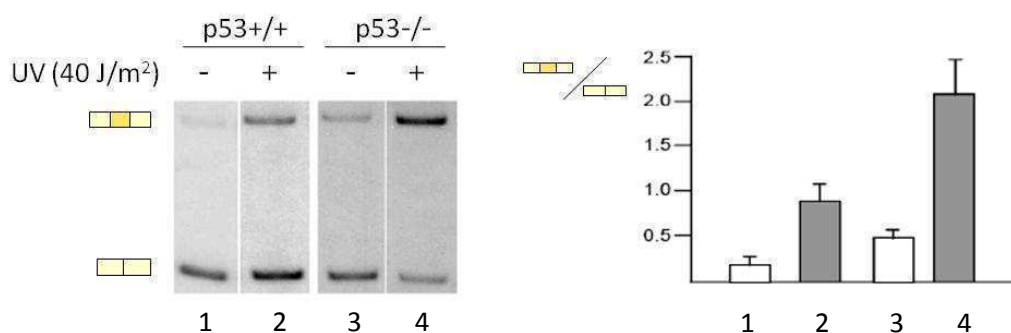
Células Hep3B fueron transfectadas con los siRNAs indicados y el minigén Tet-EDI. 48-72 hs más tarde, las células fueron irradiadas con UV y cosechadas 12 hs luego. siLUC: *small interfering* RNA para luciferasa (control). Los niveles de inclusión de EDI se analizaron por RT-PCR radiactiva. El histograma expresa el promedio  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR de dos experimentos independientes.

La figura R7 completa el análisis sobre el procesamiento 3' y el efecto de la luz UV sobre el AS, ya que células tratadas con *siRNAs* específicos contra BRCA-1 y BARD-1 e irradiadas con luz UV muestran el mismo aumento en la inclusión de EDI en respuesta a la luz UV que el observado en células transfectadas con un *siRNA* control (siLUC). El porcentaje de *knock down* obtenido para ambos mensajeros, analizado por PCR en tiempo real, fue del 80% (resultados no mostrados). Por último, resultados similares fueron obtenidos al irradiar las células con 40 J/m<sup>2</sup> (resultados no mostrados).

### **Conclusión #3. El procesamiento 3' no es responsable del efecto de la luz UV sobre el AS**

Una de las vías más estudiadas en respuesta al daño del DNA es aquella que involucra el factor de transcripción p53. Una vez que el daño es detectado, las proteínas quinasas ATM/ATR son activadas lo que finalmente provoca la estabilización de la proteína p53, involucrada en la transcripción de varios genes involucrados en la regulación del ciclo celular o la apoptosis. La importancia de la proteína p53 en mamíferos en respuesta a la luz UV es evidenciada por el efecto más conspicuo de la luz UV: el bronceado. De hecho, ratones p53 <sup>-/-</sup> no son capaces de hiperpigmentar luego de la irradiación debido a que la transcripción del gen proopiomelanocortina (POMC) es dependiente del factor de transcripción p53 (Cui, Widlund et al. 2007). Los experimentos mostrados más arriba indicarían que los efectos de la luz UV sobre el AS son independientes de este factor debido a que la

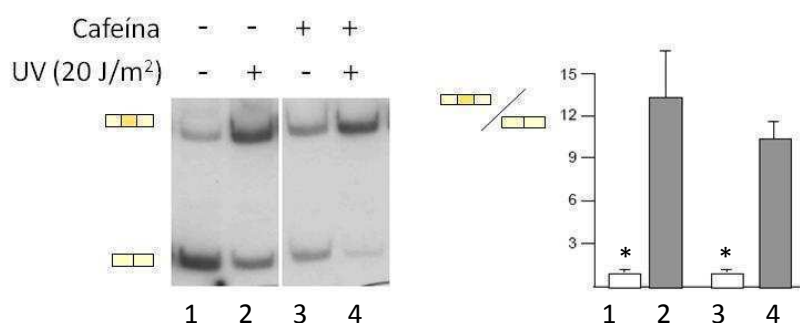
línea celular Hep3B carece del gen (*IARC TP53 Mutation Database*). Para confirmar estos datos, utilizamos las líneas isogénicas derivadas de carcinoma humano HCT116 p53+/+ y HCT116 p53-/-.



**Figura R8: El efecto de la luz UV sobre el AS es independiente de la proteína p53**

Células HCT116 salvajes (calles 1 y 2) o p53 -/- (calles 3 y 4) fueron transfectadas con el minigén Tet-EDI e irradiadas (calles 2 y 4) o no (calles 1 y 3). Las células fueron cosechadas 5 horas más tarde y los niveles de inclusión de EDI se analizaron por RT-PCR radioactiva. El histograma expresa el promedio  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR de un mínimo de tres experimentos independientes.

Como se observa al comparar los niveles de inclusión en ambas líneas, calle 4 vs calle 3 para p53 -/- y calle 2 vs calle 1 para p53 +/+, el efecto de la luz UV sobre la inclusión del exón EDI es independiente de la presencia de la proteína p53. Para finalizar con el análisis de la vía p53, se decidió inhibirla globalmente utilizando el inhibidor farmacológico cafeína, el cual inhibe la activación dependiente de daño de las proteína quinasas ATM/ATR (Sarkaria, Busby et al. 1999), o siRNAs dirigidos contra distintos componentes de la vía: ATR-IP (por *ATR interacting protein*) y Chk-1. En los tres casos, el aumento relativo causado por el UV en la inclusión de EDI fue similar. La figura R9 muestra los resultados para cafeína.



**Figura R9: El efecto de la luz UV sobre el AS es independiente de la vía ATM-ATR**

Células HCT116 p53 salvaje (calles 1 y 2) o p53  $-/-$  (calles 3 y 4) fueron transfectadas con el minigén Tet-EDI en presencia de tetraciclina y pre-tratadas con cafeína (10mM) por 3 horas. Luego, la tetraciclina fue lavada, las células irradiadas y nuevo medio con cafeína fue agregado. Las células fueron cosechadas 5 horas más tarde y los niveles de inclusión de EDI se analizaron por RT-PCR radioactiva. El histograma expresa el promedio  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR de un mínimo de tres experimentos independientes. El (\*) indica que el nivel de inclusión de la calle 1 y 3 fue tomado como 1 para facilitar el análisis.

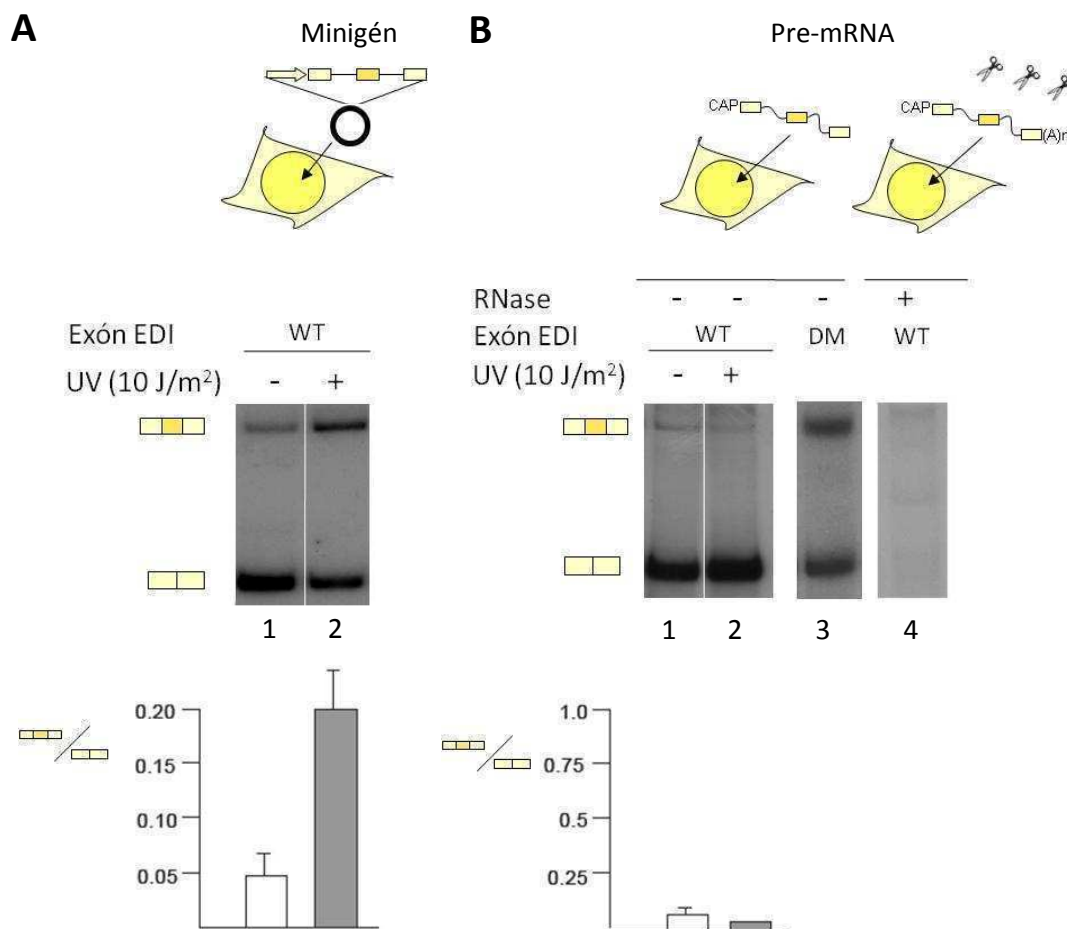
Cabe destacar que la cafeína provoca un aumento significativo en la inclusión de EDI (comparar calles 1 y 3) así como la ausencia de p53 (comparar calles 1 y 3 en la figura R8). Estos efectos, independientes de la luz UV, no serán analizados en esta tesis. A su vez, se descartó también la participación de las vías clásicamente activadas por UV como la vía de JNK o de p38 gracias a la utilización de inhibidores farmacológicos (resultados no mostrados) (Blaustein, Pelisch et al. 2004).

#### **Conclusión #4. El efecto de la luz UV es independiente de la proteína p53 y de la vía ATM-ATR**

Como se ha mencionado con anterioridad, el *splicing* puede ser co- o post-transcripcional. Dado que luego de la irradiación con luz UV existe una clara respuesta transcripcional (activación de la transcripción de ciertos genes, inhibición de la iniciación en otros) decidimos estudiar si la transcripción era necesaria para observar el efecto de la luz UV sobre el AS. Para ello decidimos transcribir, agregar el *cap* y poliadenilar *in vitro* una secuencia que contenga EDI y sus intrones y exones flanqueantes tal cual está presente en los minigenes utilizados hasta aquí. Estrategias similares han sido utilizadas previamente para analizar *splicing* post-transcripcional (Robson-Dixon y Garcia-Blanco 2004). La figura R10 muestra que el efecto de la luz sobre el AS de EDI sólo se observa cuando ambos, el *splicing* co- y post-transcripcional se pueden llevar a cabo gracias a la transfección

del minigén  $\alpha$ -globina EDI (A). Sin embargo, cuando únicamente el *splicing* post-transcripcional puede ocurrir, se observa que el AS se lleva a cabo pero el efecto de UV no es detectado (resultados similares se obtuvieron con 20 J/m<sup>2</sup>). Distintos controles apoyan esta conclusión:

- Al pre-mRNA se le agregó el *cap* y fue poliadenilado *in vitro* para reducir su degradación y mejorar su procesamiento.
- Utilizando el mismo pre-mRNA pero radiactivo hemos determinado que el 66% del precursor transfectado se acumula en la fracción nuclear y calculamos una eficiencia de *splicing* que, aunque baja, es similar a la estimada para el *splicing* *in vitro* de precursores con intrones largos (Lazarev y Manley 2007).
- El bajo nivel de inclusión obtenido en la calle B.2 no se debe a un impedimento del sistema de transfección del pre-mRNA ya que sintetizando un pre-mRNA el cual posee el sitio aceptor de EDI optimizado (calle 3) se observa un claro aumento en la inclusión de EDI.
- El pre-tratamiento del pre-mRNA con *RNasa* previene la amplificación por RT-PCR de productos *bona fide*, asegurando que los productos observados corresponden efectivamente al procesamiento del pre-mRNA transfectado.



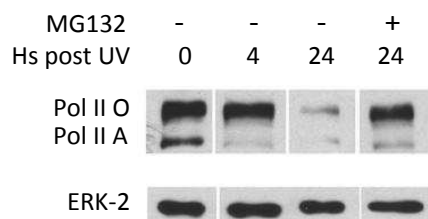
**Figura R10: El efecto de la luz UV sobre EDI sólo se observa cuando puede ocurrir el *splicing* co-transcripcional**

Células Hep3B fueron transfectadas con el minigén  $\alpha$ -globina EDI (A) o con un pre-mRNA con *cap* y poliadenilado *in vitro* (B). En la calle 3 se muestra la transfección de un pre-mRNA con el sitio aceptor optimizado (DM). En la calle 4 el pre-mRNA fue pre-tratado con *RNasa A*. Luego de la transfección las células fueron irradiadas (calle 2 en A y B) y cosechadas 20 hs más tarde. Los niveles de inclusión de EDI se analizaron por RT-PCR radioactiva. El histograma expresa el promedio  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR.

La estricta necesidad de co-transcripcionalidad en relación al efecto de UV sobre EDI llamó nuestra atención sobre las modificaciones post-traduccionales de la pol II en respuesta al daño. La iniciación de transcripción dependiente de pol II es inhibida, al menos en algunos genes, en respuesta al daño. Dos modificaciones covalentes están asociadas a este fenómeno. Tanto el UV como el cisplatino provocan primero la hiperfosforilación del CTD de la pol II seguido de la ubiquitinación de la subunidad mayor en residuos no pertenecientes al dominio carboxilo terminal. La ubiquitinación, a su vez, acelera la degradación dependiente de proteasoma (Luo, Zheng et al. 2001). Como se

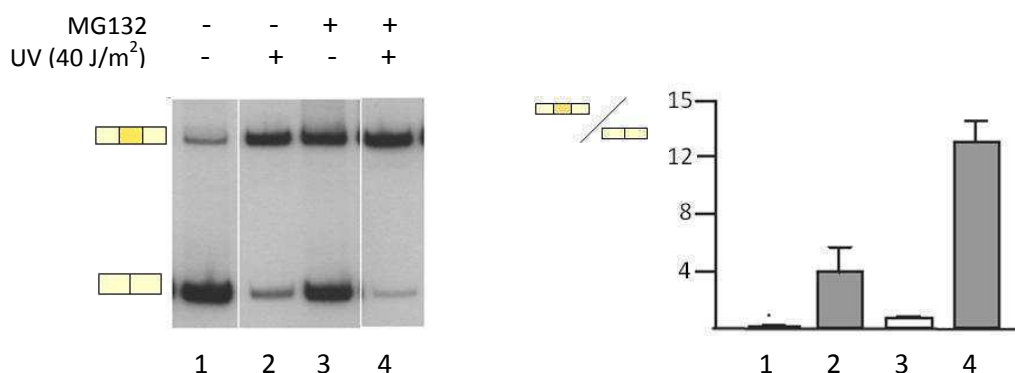
observa en el *western* de la figura R11, en respuesta a UV la pol II es hiperfosforilada (pol II O, calle 2 vs calle 1) y degradada, como se evidencia analizando la cantidad de pol II presente a las 24 hs post UV (calle 3) en relación a la cantidad de pol II en ausencia de irradiación (calle 1). La degradación vía proteasoma es destacada por la inhibición de degradación en presencia del inhibidor de proteasoma MG132 (calle 4).

**Figura R11: La pol II es hiperfosforilada y degradada vía proteasoma en respuesta a UV**



Western de extractos totales de células Hep3B irradiadas ( $20 \text{ J/m}^2$ ) y cosechadas a distintos tiempos post UV (0, 4 y 24 hs). Se utilizó un anticuerpo dirigido contra la porción N terminal de la subunidad mayor de la pol II (N20, Santa Cruz) que reconoce, por lo tanto, a la pol II en su estado hiper (pol II O) o hipo fosforilado (pol II A). En la última calle, el inhibidor del proteasoma MG132 ( $2 \mu\text{M}$  en DMSO) fue agregado a las células inmediatamente luego de la irradiación. El control de carga fue realizado utilizando un anticuerpo anti-ERK2 (Santa Cruz).

Por otra parte, la figura R12 muestra que en condiciones donde la degradación de la pol II está inhibida (calles 3 y 4), el efecto de UV sobre el AS tiene lugar.

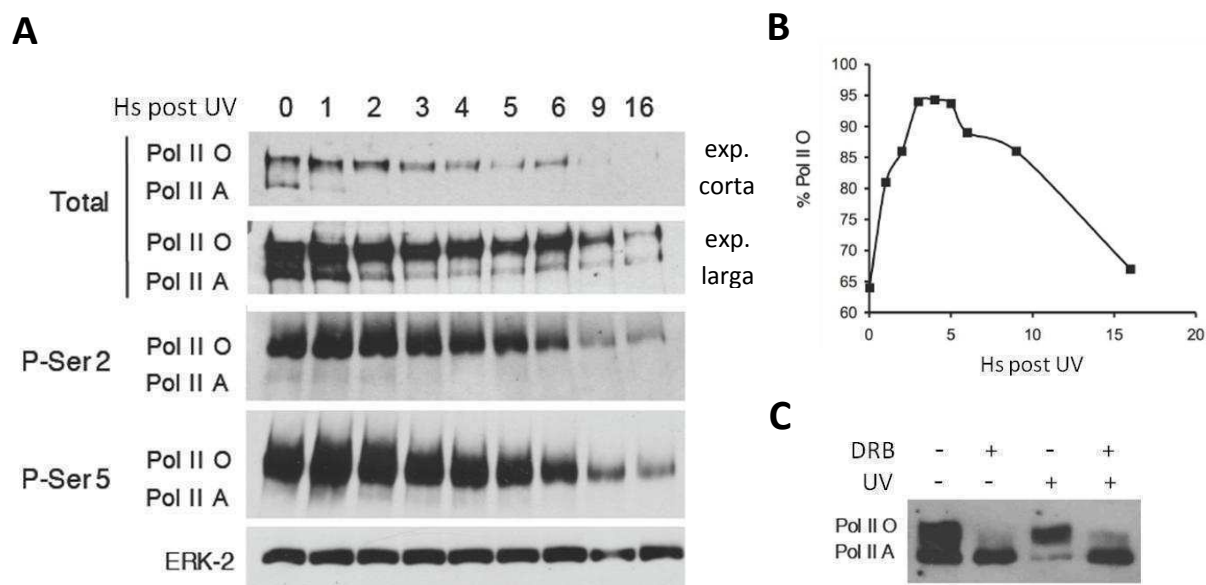


**Figura R12: Concentraciones de MG132 que inhiben la degradación de la pol II no inhiben el efecto de UV**

Células Hep3B fueron transfectadas con el minigén Tet-EDI en presencia de tetraciclina. Las células fueron luego pre-incubadas con MG132 ( $2 \mu\text{M}$ ) por 1 hora. Luego la tetraciclina fue removida, las células irradiadas y medio con MG132 fue agregado nuevamente según se indica. Cuatro horas más tarde las células fueron cosechadas. Los niveles de inclusión de EDI se analizaron por RT-PCR radioactiva. El histograma expresa el promedio  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR.

Una vez descartada la degradación y para analizar en mayor detalle si la fosforilación inducida por la luz UV estaba involucrada en el efecto sobre el AS, se realizaron ensayos de *western blot* utilizando

anticuerpos capaces de reconocer distintos residuos fosforilados así como la pol II total como se muestra en la figura R13.

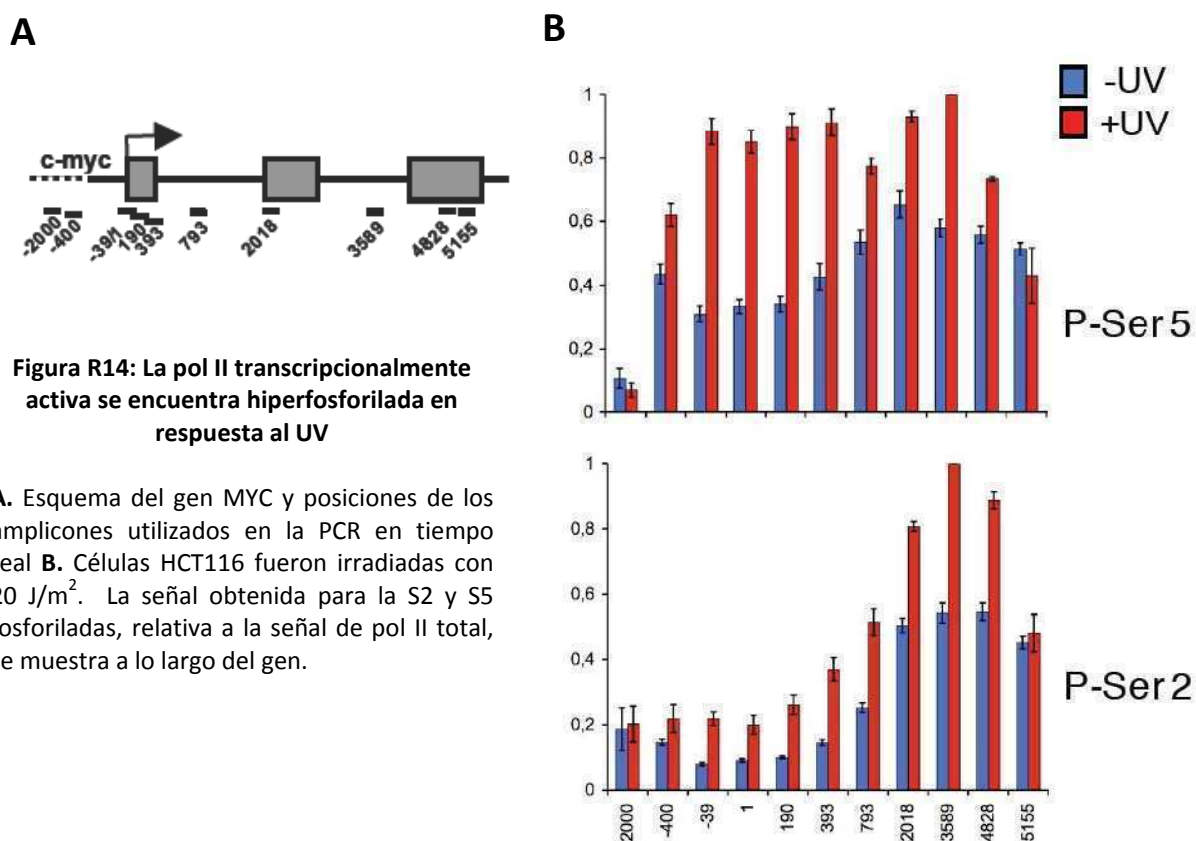


**Figura R13: Cinética de hiperfosforilación en serina 2 y serina 5 y en respuesta a UV**

**A.** Células Hep3B fueron irradiadas con  $20 \text{ J/m}^2$  y cosechadas a distintos tiempos post-UV según se indica. Para detectar la pol II total se utilizó el anticuerpo N20 (Santa Cruz). Para detectar la pol II fosforilada en el residuo serina 2 del CTD se utilizó el anticuerpo H5 (Covance). Para detectar la pol II fosforilada en la serina 5 del CTD se utilizó el anticuerpo H14 (Covance). El control de carga fue realizado utilizando un anticuerpo anti-ERK2. **B.** Densitometría de la pol II O y pol II A del panel A. **C.** Células Hep3B fueron irradiadas con  $40 \text{ J/m}^2$  e inmediatamente se les agregó medio con la droga DRB ( $50 \mu\text{M}$  en etanol). Las células se cosecharon 4 hs más tarde.

Los paneles A y B muestran cómo la pol II se hiperfosforila y degrada en respuesta a UV. Comenzando con un 65% de pol II O, 3 hs luego de la irradiación el máximo nivel de fosforilación es alcanzado (95%) y la degradación ya es evidente. Este porcentaje de hiperfosforilación se mantiene por 2 hs más y luego decae ya que la forma pol II O es preferencialmente degradada (Luo, Zheng et al. 2001). A las 16 hs la degradación es máxima y el porcentaje de hiperfosforilación retoma sus valores originales. Los residuos serina 2 y serina 5 del CTD son hiperfosforilados sin ninguna preferencia evidente. El panel C muestra que la hiperfosforilación basal y la inducida por la luz UV son inhibidas en presencia de DRB (5,6-dicloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosilbencimidazol) la cual, si bien con cierta controversia, se acepta que inhibe la quinasa dependiente de ciclinas CDK9. De aquí se concluye que la pol II O está fosforilada en los residuos serina 2 y serina 5 del CTD y que esta fosforilación aumenta al irradiar las células con luz UV. El hecho de que la pol II se hiperfosforile en respuesta a UV analizando extractos totales permite suponer que, al menos en ciertos genes, la pol II

asociada al DNA este también hiperfosforilada en las serinas 2 y 5. Para ello, y en colaboración el laboratorio del Doctor David Bentley (Colorado, EEUU), realizamos ensayos de ChIP (*Chromatin immunoprecipitation*, inmunoprecipitación de la cromatina) utilizando anticuerpos que reconocen a los residuos serina 2 y serina 5 fosforilados. El ChIP se realizó sobre el gen MYC ya que éste ha sido bien caracterizado en el laboratorio del Doctor Bentley.

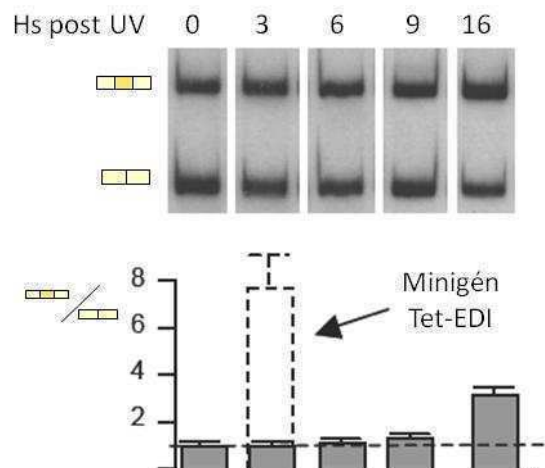


En este punto quisimos conocer, utilizando las mismas muestras que en la figura R13, la cinética del cambio en el AS de EDI. La figura R15 muestra el cambio en los niveles de inclusión de EDI en relación al tiempo post UV. Como era esperable, el cambio en el minigén transfectado se observa inmediatamente debido a que estamos analizando sólo la transcripción de *novo*. Probablemente para el caso de EDI endógeno, las 16 hs necesarias para observar un claro efecto de UV sean un compromiso entre la cantidad de mensajero presente antes de la irradiación, las tasas de transcripción y la vida media, la cual es de aproximadamente 5-6 hs independientemente del UV (resultados no mostrados).



**Figura R15: Correlación entre la fosforilación de la pol II y el AS de EDI**

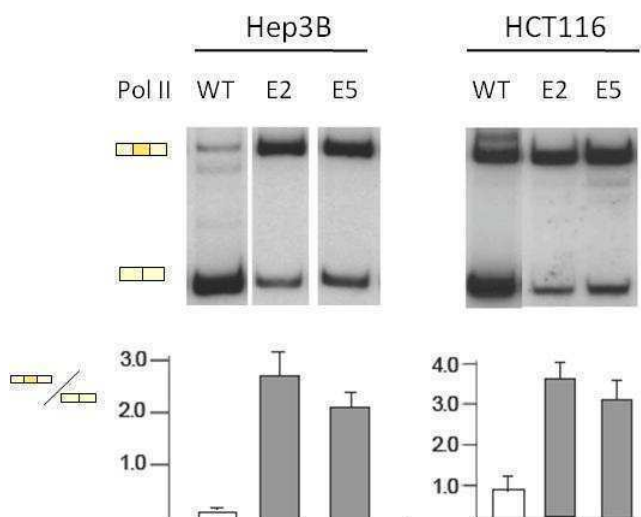
En las muestras de la figura R13 se determinó en paralelo el nivel de inclusión de EDI endógeno en función del tiempo post-UV. La barra punteada muestra el efecto de UV sobre el minigén Tet-EDI a las 3 hs. Para facilitar la comprensión del gráfico, los valores se encuentran relativizados al nivel de inclusión en 0 hs. Los niveles de inclusión de EDI se analizaron por RT-PCR radioactiva. El histograma expresa el promedio  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR.



Bajo una estricta necesidad de co-transcripcionalidad y ya descartada la vía de degradación, decimos poner a prueba la hipótesis de que la hiperfosforilación en serina 2 y 5 del CTD (observada tanto en extractos totales como así también para la pol II comprometida en la transcripción) estaba involucrada en el efecto de la luz UV. Si la hiperfosforilación del CTD inducida por la luz UV es necesaria para observar el efecto sobre el AS, el uso de una polimerasa mutada en su CTD de manera de imitar la hiperfosforilación inducida por la luz UV debería, en ausencia de irradiación, provocar un aumento en los niveles de inclusión de EDI. Para ello, y gracias a las construcciones cedidas por el Doctor David Bentley, realizamos el siguiente experimento: transfectamos el minigén reportero Tet-EDI junto con plásmidos de expresión de la subunidad mayor de la pol II con su CTD salvaje o con los residuos del CTD serina 2 o serina 5 reemplazados por ácido glutámico de manera de imitar la fosforilación inducida por UV. Estas polimerasas tienen una mutación adicional que les confiere resistencia a la  $\alpha$ -amanitina, lo que permite inhibir la polimerasa endógena sin afectar la transfectada (de la Mata, Alonso et al. 2003).

**Figura R16: Mutantes de pol II que imitan el estado fosforilado, reproducen el efecto de UV**

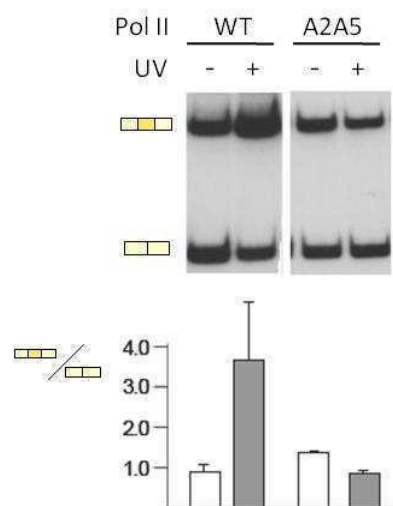
Células Hep3B o HCT116 fueron transfectadas con el minigén Tet-EDI en presencia de tetraciclina y construcciones que expresan la subunidad mayor de la pol II resistente a  $\alpha$ -amanitina con su CTD salvaje (WT), mutante con glutámico en posición 2, E2, o mutante en posición 5, E5. Luego de 12 hs, las células fueron tratadas con  $\alpha$ -amanitina y 12 hs más tarde la tetraciclina fue removida para inducir la transcripción. 24 hs después las células fueron cosechadas. En presencia de una pol II WT pero sensible a  $\alpha$ -amanitina no se observa producto de RT-PCR. Los niveles de inclusión de EDI se analizaron por RT-PCR radioactiva. El histograma expresa el promedio  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR.



La figura R16 muestra que ambas polimerasas (E2 y E5) causan el mismo efecto que la luz UV sobre el AS. De manera lógica nos propusimos el experimento opuesto. Utilizar una mutante con sus serinas 2 y 5 reemplazadas por alaninas (polimerasa A2A5).

**Figura R17: El efecto de UV sobre el AS de EDI es depende de la fosforilación del CTD**

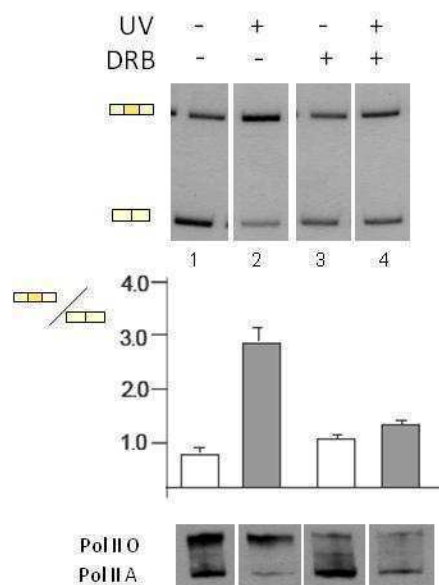
Células HCT116 fueron transfectadas con el minigén Tet-EDI en presencia de tetraciclina y construcciones que expresan la pol II WT o A2A5. Luego de 12 hs, las células fueron tratadas con  $\alpha$ -amanitina y 12 hs más tarde la tetraciclina fue removida y las células irradiadas ( $50 \text{ J/m}^2$ ). 24 hs luego las células fueron cosechadas. Los niveles de inclusión de EDI se analizaron por RT-PCR radioactiva. El histograma expresa el promedio  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR.



La figura R17 muestra que cuando la transcripción es llevada a cabo por una polimerasa con sus serinas 2 y 5 reemplazadas por alaninas (A2A5) la inclusión de EDI, en respuesta al UV, no se modifica. Este experimento predice que al utilizar la droga DRB para inhibir la hiperfosforilación del CTD en respuesta a UV deberíamos inhibir también el efecto sobre el AS. La dificultad con este experimento es que el DRB *per se* afecta la inclusión de EDI en el mismo sentido que el UV, al menos en ciertas líneas celulares como Hep3B (Nogues, Kadener et al. 2002). Como se muestra en la figura R18 el DRB, así como la polimerasa mutante A2A5 en la figura anterior, tiene un pequeño efecto sobre la inclusión basal de EDI (comparar calles 1 y 3), al menos en las células HCT116, cuando se lo compara con los niveles de inclusión obtenidos al irradiar estas células (compara calles 1 y 2). Sin embargo, el efecto de la luz UV es inhibido en presencia de esta droga lo que confirma la importancia de la fosforilación del CTD en esta respuesta. Cabe mencionar aquí que los niveles de inducción obtenidos por las polimerasas mutantes (medidos utilizando un reportero inducible de luciferasa) fueron del 3 al 13% en relación a una pol II salvaje no detectándose inducción o producto de RT-PCR al utilizar una pol II salvaje pero sensible a  $\alpha$ -amanitina.

**Figura R18: El DRB inhibe el efecto del UV**

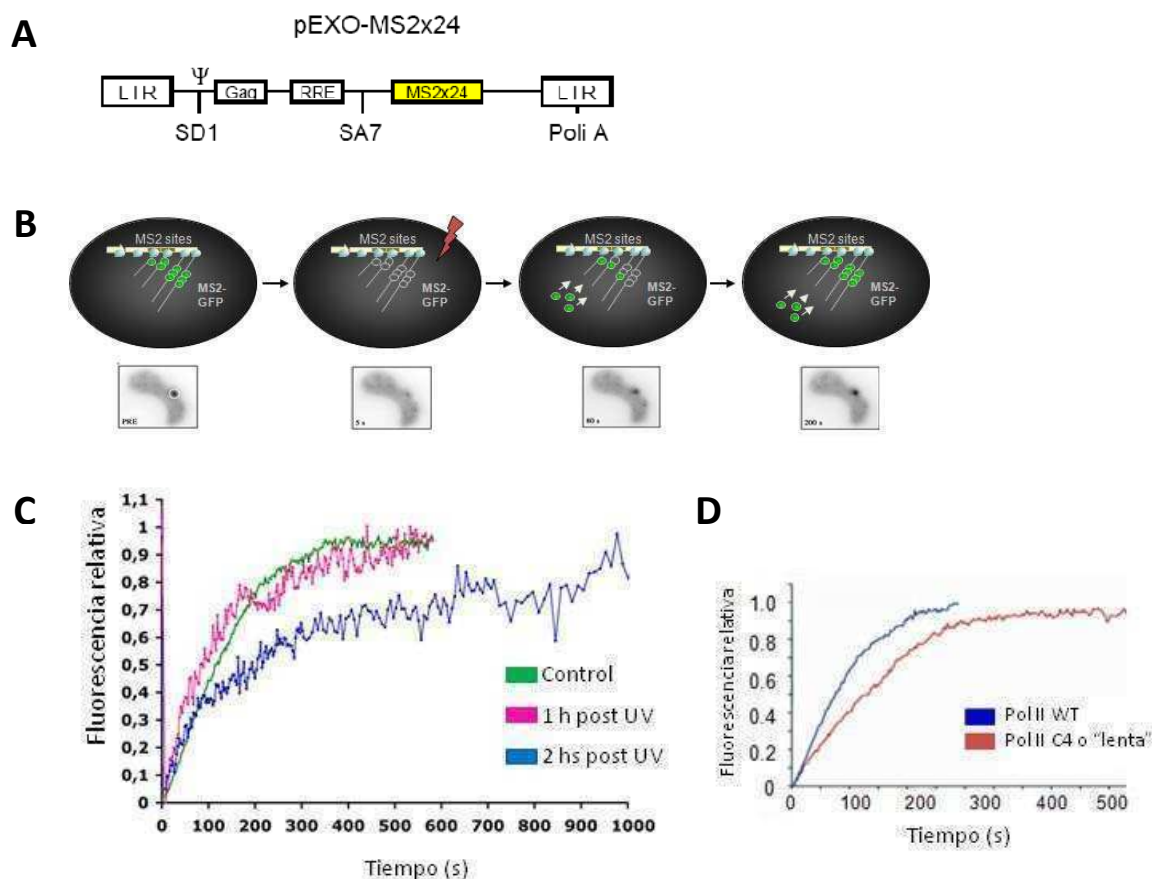
Células HCT116 fueron transfectadas con el minigén Tet-EDI en presencia de tetraciclina. Cuando se indica, las células fueron pre-tratadas con DRB (50 $\mu$ M) por 2 hs e irradiadas con 40 J/m<sup>2</sup>. Cinco hs más tarde las células fueron cosechadas para determinar en paralelo los niveles de inclusión de EDI y el grado de fosforilación de la pol II. Como control se muestra el western (anticuerpo N20) de extracto total. Los niveles de inclusión de EDI se analizaron por RT-PCR radioactiva. El histograma expresa el promedio  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR.



**Conclusión #5. La fosforilación en los residuos serina 2 y 5 del CTD de la pol II es necesaria y suficiente para observar el efecto de la luz UV sobre el AS de EDI**

Al día de hoy no se ha podido descifrar el porqué de las 52 repeticiones del CTD, las diferencias entre estas 52 repeticiones o las implicancias de las modificaciones post-traduccionales sobre los residuos que componen a este dominio. En un escenario simplificado se ha asociado a la fosforilación de la serina 5 con la estimulación de la iniciación transcripcional y a la fosforilación de la serina 2 con la estimulación de la elongación transcripcional. En este marco teórico y dado que nuestros resultados con las mutantes E2 y E5 son similares, no podemos concluir sobre cuál etapa (iniciación, elongación o tal vez ninguna de las dos) actúa la luz UV. Para ahondar en este problema, y en colaboración con el laboratorio del Doctor Edouard Bertrand en Montpellier, Francia, decidimos estudiar el efecto de la luz UV en la biogénesis del mRNA *in vivo* y en tiempo real utilizando la técnica de FRAP (Figura R19). Para esto utilizamos células (*ExoLong*) que tienen integrado en su genoma una construcción, con promotor de HIV-1, que posee 24 sitios de unión para la proteína viral MS2. Estas células fueron transfectadas con una construcción que expresa la proteína de fusión MS2-GFP la cual puede unirse a los elementos MS2 del mensajero naciente observándose el sitio de transcripción dentro de cada núcleo como un punto brillante en el nucleoplasma. Esto es consecuencia de la alta concentración de RNA en el punto de síntesis, que resulta del estado estacionario alcanzado entre la velocidad de síntesis y difusión de los mensajeros. Al irradiar los sitios de transcripción con un láser, la fluorescencia de la MS2-GFP asociada al RNA naciente es extinguida por el fenómeno de *quenching*. Sin embargo, nada impide que las polimerasas continúen sintetizando nuevos sitios MS2 lo cual

finalmente conlleva a la recuperación de la fluorescencia posterior a la extinción (estrategia de FRAP) (Figura R19). Para los fines de estos experimentos, la unión entre MS2-GFP y los elementos MS2 del RNA naciente es lo suficientemente estable como para permitir evaluar diferencias en la dinámica de movilidad y/o síntesis de los RNAs y no el simple intercambio de MS2-GFP entre la fracción libre y la unida al mensajero. La velocidad de elongación de la pol II puede por lo tanto ser medida al determinar el tiempo de recuperación de la fluorescencia después de la extinción (Boireau, Maiuri et al. 2007). Un punto importante a considerar es que la tasa de iniciación de la transcripción no varíe en los, aproximadamente, 5-10 minutos que dura el ensayo (tiempo de recuperación). Así, sólo la elongación determina el tiempo de recuperación de la fluorescencia. Las células fueron entonces tratadas o no con luz UV ( $40 \text{ J/m}^2$ ) y el tiempo de residencia de los mRNAs nacientes en su sitio de transcripción fue determinado por fotoblanqueado de la proteína MS2-GFP unida al mRNA. En células no irradiadas, la recuperación de la fluorescencia demoró 6 minutos. Esta curva ha sido previamente interpretada con un modelo de dos pasos conteniendo una línea recta inicial que corresponde a elongación seguida de una curva exponencial que corresponde a la formación del extremo 3' y a la liberación del transcripto del foco de transcripción. Una hora luego de la irradiación con luz UV se obtiene una curva similar, lo que indica que no hay mayores alteraciones en la síntesis de mRNA. Sin embargo, 2 horas luego del tratamiento con UV, la recuperación de la fluorescencia es marcadamente más lenta en relación a las células no tratadas (123 versus 218 segundos). La comparación de las curvas de las células no tratadas y de las irradiadas 2 horas antes del fotoblanqueado muestra que la línea recta inicial posee la misma pendiente hasta los 80 segundos pero a partir de aquí las células irradiadas con UV se recuperan más lento. Dado que en este sistema la elongación ocurre durante los primeros 148 segundos, estos resultados indican que el tratamiento con UV inhibe la elongación. Esta conclusión es apoyada por el hecho de que la curva de FRAP que se obtiene al realizar este experimento con una mutante de pol II lenta es similar.



**Figura R19: La luz UV inhibe la elongación de la pol II *in vivo***

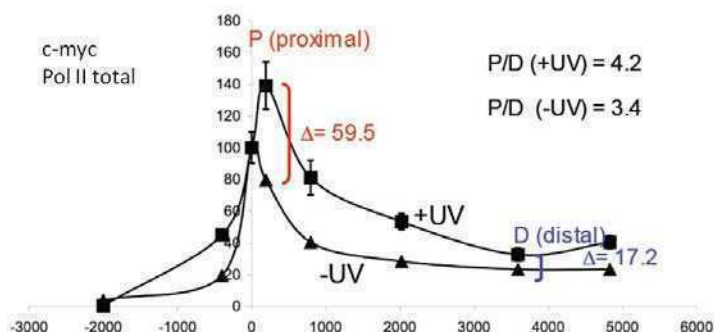
Cinética de la biogénesis de mRNAs *in vivo* y en tiempo real utilizando la técnica de FRAP **A**. Reportero de HIV-1 (pEXO-MS2x24). El reportero contiene 24 repeticiones de MS2 insertadas en la región 3'UTR, y los elementos más importantes de HIV-1: el LTR 5' (*Long terminal repeat*), el sitio donador principal de *splicing* (SD1), la señal de empaquetamiento ( $\Psi$ ), el gen de la proteína Gag, el elemento regulador RRE, el sitio aceptor de *splicing* A7 (SA7), y el LTR 3' que lleva a cabo el procesamiento 3'. **B**. Esquema del procedimiento. El área redondeada indica el sitio de transcripción blanqueado. La recuperación de la fluorescencia se evalúa a distintos tiempos indicados en segundos (s). **C**. Células ExoLong fueron transfectadas con vectores de expresión MS2-GFP 16 horas antes de la irradiación con UV (40 J/m<sup>2</sup>). Las curvas de FRAP fueron obtenidas por seguimiento de los focos de transcripción en 3D por 15 minutos con un microscopio de campo ancho. La fluorescencia está normalizada a 1 respecto de la intensidad inicial del sitio de transcripción. **D**. Curvas de recuperación de la fluorescencia para las polimerasas WT y C4.

Otra manera de estudiar los efectos de la luz UV sobre la elongación de la pol II es el análisis de la distribución de esta enzima a lo largo de un gen gracias a la técnica de ChIP. En respuesta a la luz UV la cantidad de pol II en el promotor de MYC disminuye 8 veces. Sin embargo si se normalizan los enriquecimientos para cada condición (con y sin UV) al 100% en la región promotora (posición +1), la distribución de la pol II en las células irradiadas muestra una acumulación hacia las zonas proximales al promotor (Fig. R20). Estos resultados pueden ser interpretados como prueba, independiente del

FRAP, de una elongación reducida de la pol II en respuesta a UV. Sin embargo vale destacar que esta es una situación ideal en la cual los efectos sobre la iniciación son supuestos como nulos.

**Figura R20: En respuesta al UV la pol II se acumula en la zona proximal al promotor**

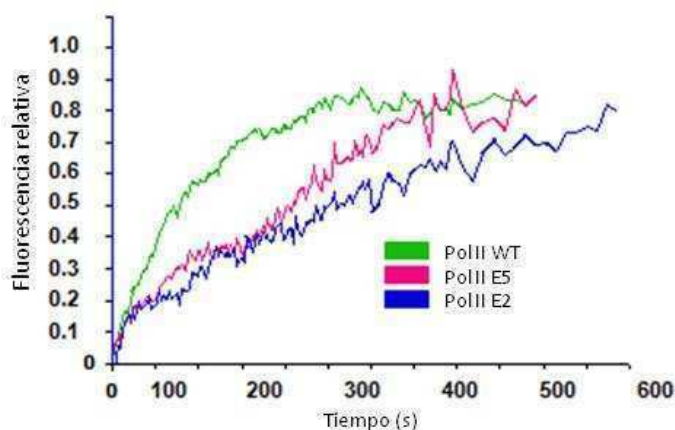
Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) sobre el gen MYC en células HCT116. Las mismas muestras de la figura R14 fueron utilizadas para graficar los enriquecimientos de pol II total en cada condición (células irradiadas, cuadrados y células control, triángulos). Los enriquecimientos en el promotor (posición +1) fueron normalizadas a 100/ en ambos casos.



Dado que los resultados de la figura R16 mostraron que las mutantes E2 y E5 imitan el efecto de la luz UV, decidimos estudiar el comportamiento de estas enzimas *in vivo*. Para esto medimos el tiempo de residencia de los RNAs transcripts por estas enzimas, utilizando el sistema MS2-GFP FRAP. Las polimerasas mutantes fueron transfectadas transitoriamente junto con MS2-GFP, en células *ExoShort*, y la polimerasa endógena fue inhibida gracias al agregado de  $\alpha$ -amanitina. El tiempo de recuperación de los mRNAs nacientes transcripts por las mutantes E2 y E5 fue considerablemente mayor que el de una polimerasa salvaje, pero resistente a  $\alpha$ -amanitina, utilizada como control (Figura R21). De hecho, la recuperación de la mitad de la fluorescencia ocurrió en 78 segundos para la pol II salvaje, pero 213 y 270 segundos para las mutantes E2 y E5 respectivamente. Este mayor tiempo de residencia es mayormente debido a un mayor tiempo necesario para la transcripción y no debido a una alteración en el procesamiento 3' del transcripto. En estas células la elongación ocurre durante los primeros 60 segundos. En este tiempo las mutantes E2 y E5 sólo recuperaron la mitad de la señal de la polimerasa salvaje (0,43 vs 0,25 y 0,21).

**Figura R21: Las polimerasas mutantes E2 y E5 tienen disminuida su tasa de elongación**

Cinética de la biogénesis de mRNA *in vivo* y en tiempo real. Células *ExoShort* fueron transfectadas con vectores de expresión MS2-GFP y polimerasas salvajes o E2 y E5. Las células fueron tratadas con  $\alpha$ -amanitina antes de que se realice el FRAP. Las curvas de recuperación de la fluorescencia fueron obtenidas por seguimiento de los focos de transcripción en 3D por 15 minutos con un microscopio de campo ancho. La fluorescencia está normalizada a 1 respecto de la intensidad inicial del sitio de transcripción



Estos resultados ponen de manifiesto la sobre simplificación que existe en relación a la fosforilación en serina 5 y 2 como marcas de iniciación y elongación respectivamente ya que la figura anterior muestra a ambas polimerasas mutantes (E2 y E5) con una elongación disminuida.

**Conclusión #6. La fosforilación (inducida por UV u obtenida artificialmente) en los residuos serina 2 y 5 del CTD disminuye la tasa de elongación de la pol II**

### Sobre las proteínas SR y la luz UV

Como se comentó en la introducción, las proteínas SR son importantes reguladoras del *splicing*, tanto constitutivo como alternativo. Durante el desarrollo de esta tesis se buscaron evidencias de la participación de estas proteínas en respuesta a UV. Utilizando siRNAs específicos contra las proteínas SR SF2/ASF, 9G8, SRp55, SRp75 y SC35 y contra hnRNPA1 se determinó que el incremento relativo de EDI en respuesta a UV era similar al utilizar cualquiera de estos siRNAs o un siRNA control. Por otra parte, como se comentó en la Introducción, se ha reportado que la irradiación con luz UV disminuye la concentración nuclear de factores relacionados a la regulación del *splicing* como hSlu7 o hnRNPA1. Sin embargo, las dosis de UV utilizadas en esos trabajos, desde 200 a miles de  $\text{J/m}^2$ , son mucho mayores a las usadas a lo largo de esta tesis (10 a  $50 \text{ J/m}^2$ ) y, además, no hemos encontrado diferencias en la localización (por ensayos de inmunofluorescencia) de las proteínas SF2/ASF, SC35 y SRp20. Por último el efecto relativo del UV sobre la inclusión de EDI es el mismo al utilizar el minigén Tet-EDI o bien una versión con el ESE (*exonic splicing enhancer*) deletado. El ESE es una de las regiones del minigén Tet-EDI donde las proteínas SR pueden unirse y estimular así la inclusión del exón. Todas estas evidencias no pueden, por supuesto, descartar la participación de alguna proteína reguladora del *splicing*, por ejemplo alguna de la familia de las SR, en condiciones de estrés por luz UV. Sin embargo, y dado que en este caso representan únicamente evidencias negativas, todos estos resultados no serán presentados formalmente.

### Sobre otras modificaciones post-traduccionales del CTD

Durante el desarrollo de esta tesis nos enteramos que el laboratorio de la Doctora Jean Wang (UCSD, EEUU), trabajando en estrés y AS, había hecho descubrimientos en nuestra misma línea de pensamiento. Este trabajo (J. Wang, comunicación personal) describe como en respuesta al tratamiento con la droga doxorubicina se activa la proteína quinasa de tirosinas ABL la cual fosforila la tirosina 1 del CTD de la pol II. Asociado a esta fosforilación describen como el AS del gen CD44 es afectado. Sin embargo este mecanismo no es el responsable del efecto de la luz UV sobre el AS aquí descrito ya que hemos demostrado lo siguiente:

- El tratamiento de células Hep3B con doxorubicina no altera la relación inclusión-exclusión de EDI



- El uso de un inhibidor farmacológico de ABL (PD166326, gentilmente cedido por la Doctora J. Wang) no altera la estimulación, UV-dependiente, de la inclusión de EDI
- Datos bibliográficos muestran que el UV no activa la quinasa de tirosinas ABL

Estos datos tampoco serán formalmente presentados a lo largo de esta tesis.

## Capítulo II

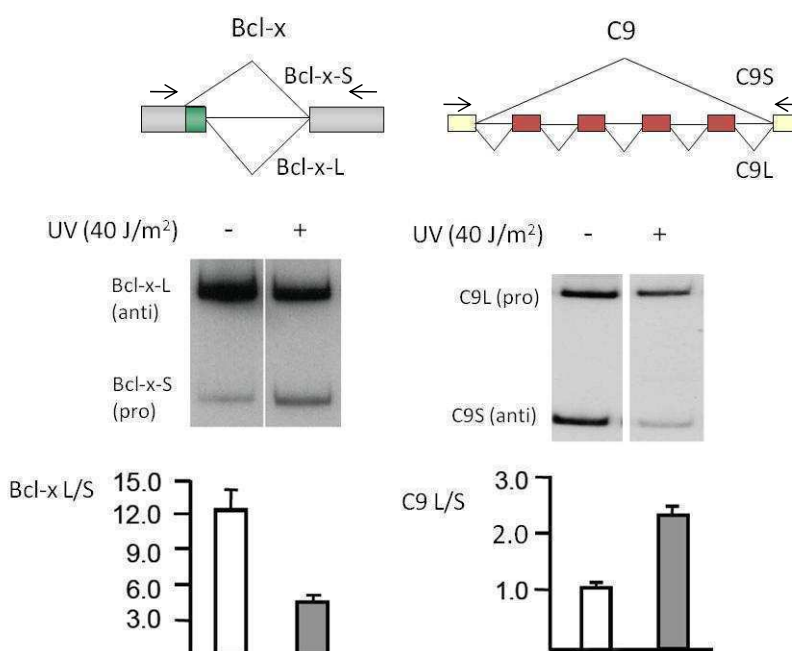
### La luz ultravioleta y el *splicing* alternativo de los genes Bcl-x y Caspasa 9

Los resultados presentados en el capítulo I sobre el AS del gen de la fibronectina en respuesta al daño inducido por la luz UV fueron valiosos para obtener evidencias mecanísticas sobre la regulación de la transcripción y cómo el AS es afectado en consecuencia. Sin embargo, al menos *a priori*, no hay una clara relación entre la respuesta al daño del DNA y el AS del exón EDI del gen de la fibronectina humana. En el presente capítulo se intentará ahondar en la fisiología de la respuesta al estrés provocado por la luz UV estudiando dos genes de vital importancia en esta situación: Bcl-x y caspasa 9 (C9).

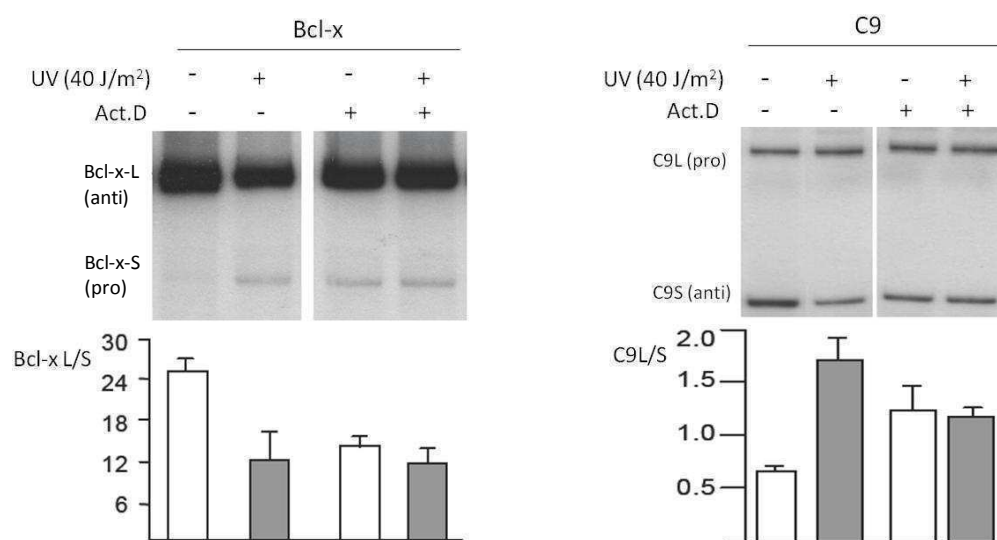
Para extender el conocimiento sobre como la transcripción y el AS son modulados luego de un estrés genotóxico, se irradiaron células Hep3B y se midió la proporción de las isoformas pro- y anti-apoptóticas de los genes Bcl-x y C9, vitales en la modulación de la apoptosis.

**Figura R22. La luz UV afecta la relación de isoformas pro- y anti-apoptóticas de los genes Bcl-x y C9 favoreciendo, en ambos casos, la isoforma pro-apoptótica**

Células Hep3B fueron irradiadas con luz UV y 12 hs más tarde el RNA fue purificado. Las relaciones entre las isoformas pro- y anti-apoptóticas fueron analizadas por RT-PCR radiactiva. El histograma expresa el promedio  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR de un mínimo de tres experimentos independientes. Las posiciones relativas de los *primers* utilizados en las PCRs se muestran con flechas en los diagramas de los genes Bcl-x y C9



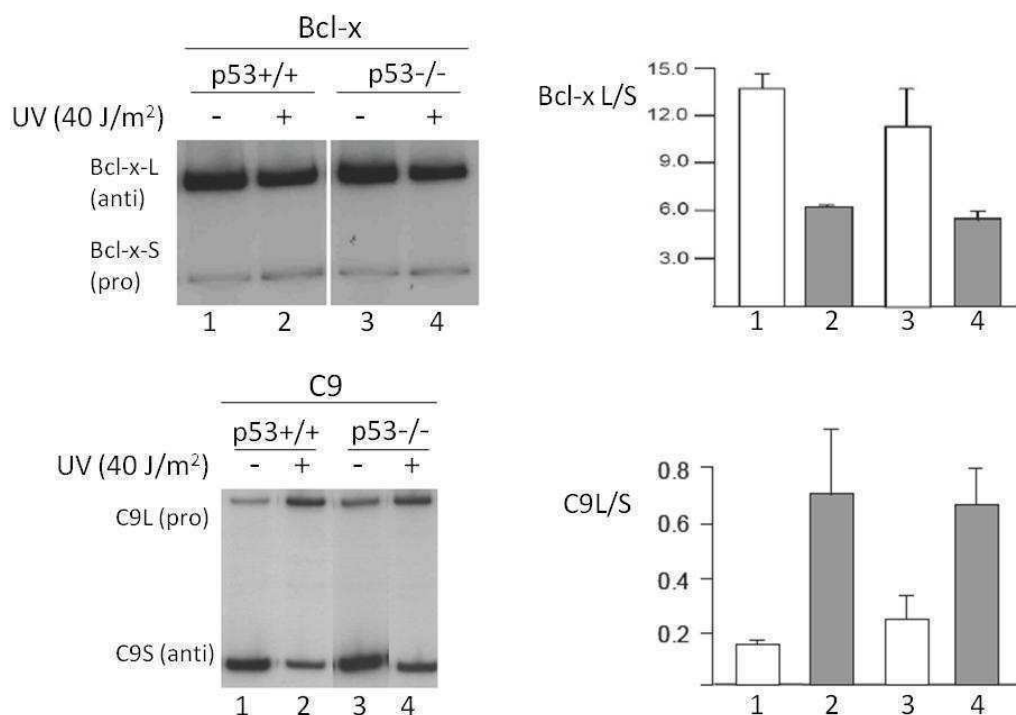
Como se observa en la figura R22, la irradiación con luz UV de células Hep3B altera las proporciones de los mensajeros de Bcl-x y C9. En ambos casos se favorece la isoforma pro-apoptótica la cual es el resultado de dos sitios dadores alternativos (Bcl-x) o de 4 exones cassette incluidos en bloque (C9). Resultados similares fueron obtenidos utilizando cisplatino (no se muestra), lo que, al igual que para el gen de la fibronectina, sugiere que el daño al DNA está involucrado en la respuesta. La figura R23 muestra que en presencia del inhibidor transcripcional actinomicina D el UV no puede modificar las relaciones pro/anti-apoptóticas de Bcl-x y C9 confirmando que actúa modificando los patrones de AS. Cabe destacar que la actinomicina D *per se* provoca alteraciones en las cantidades relativas de las dos isoformas, así como lo había hecho para el exón EDI (comparar calles 1 y 3 en la fig. R3). No se ha investigado en esta tesis el porqué de esta respuesta, pero se ha descrito la activación de numerosas cascadas de señalización en respuesta al estrés transcripcional provocado por la actinomicina.



**Figura R23. La luz UV afecta el *splicing* alternativo del Bcl-x y C9**

Células Hep3B fueron tratadas con actinomicina D (5µg/ml) y luego de una hora se irradiaron agregándose inmediatamente nuevo medio con o sin droga según se indica. Luego de 10 hs las células fueron cosechadas y las proporciones pro- y anti-apoptóticas fueron analizadas por RT-PCR. El histograma expresa el promedio  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR de dos experimentos independientes.

Para confirmar que el aumento dependiente de UV de las isoformas pro-apoptóticas de los genes Bcl-x y C9 se obtiene en presencia o ausencia de la proteína p53, se utilizaron las líneas HCT116 p53+/+ y -/-. La figura R24 muestra que en ambas líneas celulares se observa un aumento similar en las isoformas pro-apoptóticas de estos genes.

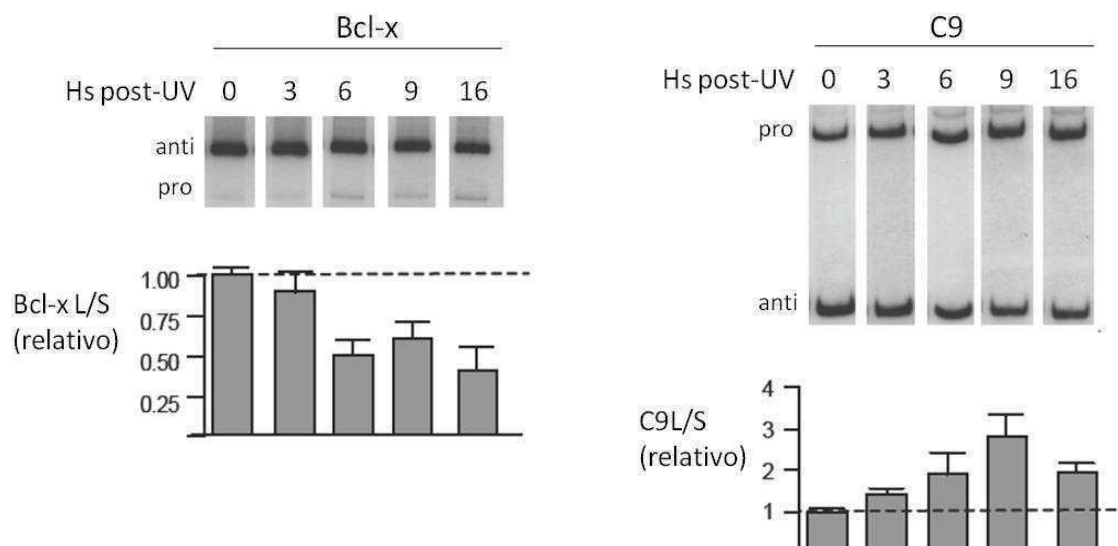


**Figura R24: El efecto de la luz UV sobre Bcl-x y C9 es independiente de la proteína p53**

Células HCT116 salvajes (calles 1 y 2) o p53 -/- (calles 3 y 4) fueron irradiadas (calles 2 y 4) o no (calles 1 y 3). Las células fueron cosechadas 10 horas más tarde y la proporción de isoformas pro- y anti-apoptóticas fue analizada por RT-PCR radioactiva. El histograma expresa el promedio  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR de un mínimo de tres experimentos independientes.

#### **Conclusión #7. El UV modifica el AS de los genes Bcl-x y C9 favoreciendo las isoformas pro-apoptóticas de manera independiente de p53**

Para evaluar la cinética de los cambios en el AS de Bcl-x y C9 en relación al nivel de fosforilación de la pol II realizamos, utilizando las mismas muestras de la figura R13, RT-PCRs radiactivas como se muestra en la figura R25.



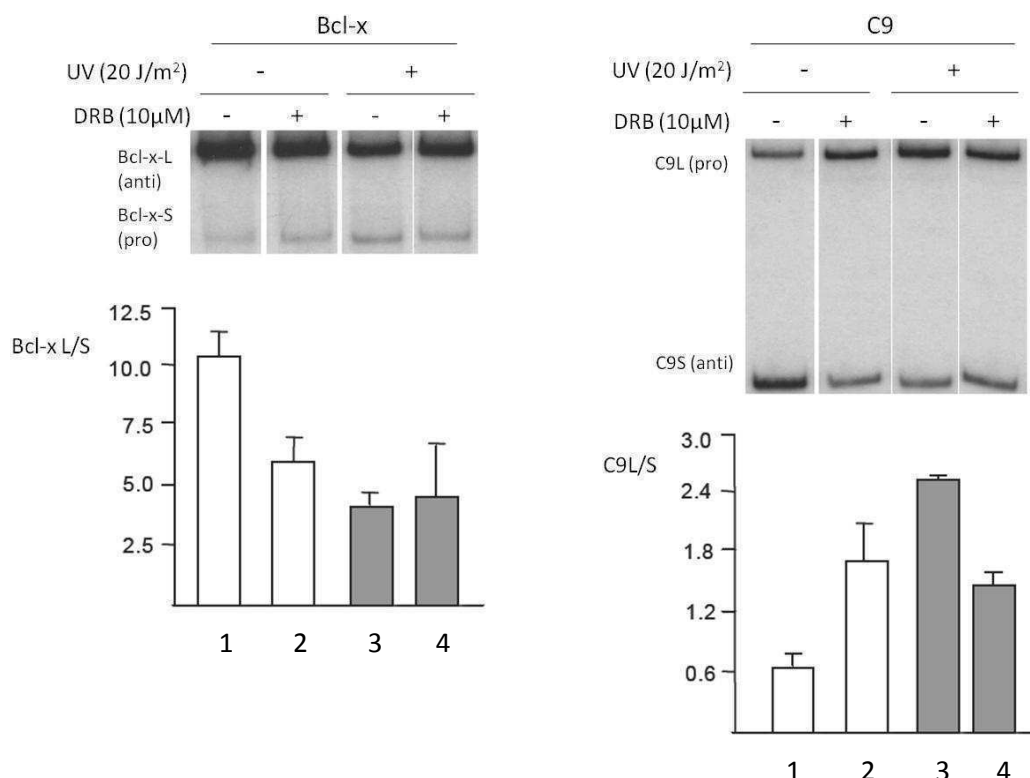
**Figura R25: El AS de Bcl-x y C9 en función del tiempo**

En las muestras de la figura R13 se determinó en paralelo la proporción de isoformas pro- y anti-apoptóticas de Bcl-x y C9 en función del tiempo post-UV (20 J/m<sup>2</sup>). Para facilitar la comprensión y comparación, los valores se encuentran relativizados al nivel de inclusión en 0 hs (ver figura R15 para FN). La proporción de isoformas pro- y anti-apoptóticas fue analizada por RT-PCR radioactiva. El histograma expresa el promedio  $\pm$  SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR de tres experimentos independientes

Analizando las figuras R13, R15 y R25 se observa que los genes FN, Bcl-x y C9 cambian sus patrones de AS con distinta cinética pero que, en los tres casos, es subsiguiente al pico de fosforilación de la pol II. La variación de la respuesta en relación al tiempo puede deberse, entre otras cosas, al tiempo necesario para sobrepasar la cantidad de mensajero previamente sintetizado. Por ejemplo, en el caso de FN, la vida media del mRNA es de 5-6 hs independientemente de la irradiación con luz UV (no se muestra) y el cambio se observa entre las 9 y las 16hs post UV. A su vez, resulta al menos intuitivo que los dos genes de respuesta a estrés cambien sus patrones rápidamente dada la función celular que sus proteínas desempeñan.

Para investigar la causalidad de la correlación observada entre la fosforilación de la pol II y los cambios observados en el AS de Bcl-x y C9, se trataron células Hep3B con DRB y UV (Figura R26). A diferencia de lo que ocurrió para el exón EDI en células HCT116 aquí el DRB presenta, tanto para C9 como para Bcl-x, un efecto basal (comparar calles 1 y 2) en el mismo sentido que el efecto del UV (comparar calles 1 y 3). Sin embargo al irradiar células tratadas con DRB no se observa un cambio adicional en la relación de isoformas (comparar calles 3 y 4) lo que sugiere que el efecto de la luz UV

sobre el AS de Bcl-x y C9 es inhibido por el DRB. En conjunto, este experimento sugiere que el AS de estos dos genes es afectado por el nivel de fosforilación del CTD.



**Figura R26: La luz UV no modifica la relación de isoformas pro- y anti- apoptóticas en células tratadas con DRB**

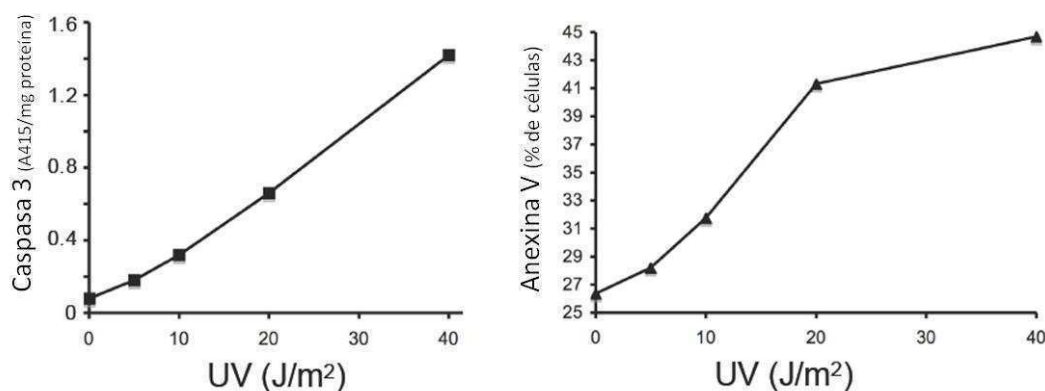
Células Hep3B fueron irradiadas con luz UV (20 J/m<sup>2</sup>) e inmediatamente medio con o sin DRB (10 μM) fue agregado según se indica. Siete horas más tarde las células fueron cosechadas y la proporción de isoformas pro- y anti-apoptóticas de Bcl-x y C9 fue analizada por RT-PCR radiactiva. El histograma expresa el promedio ± SD de los cocientes entre la radiactividad de las bandas de RT-PCR.

#### **Conclusión #8. El AS de Bcl-x y C9 es afectado por el estado de fosforilación del CTD**

Intentamos luego determinar si las polimerasas mutantes E2 y E5 provocaban cambios en los patrones de AS similares a los observados con UV. El antecedente de que la polimerasa mutante delta 0, la cual carece del dominio CTD, era incapaz de transcribir genes endógenos pero era capaz de hacerlo sobre minigenes transfectados transitoriamente (de la Mata y Kornblihtt 2006) agregaba otro nivel de complejidad. Sin embargo los experimentos mostrados en las figuras R19 y R21 muestran que estas polimerasas eran capaces de transcribir el gen reportero del FRAP el cual se encuentra integrado establemente. Desafortunadamente nos encontramos con otro problema: el

agregado de  $\alpha$ -amanitina, incluso en presencia de una pol II WT resistente a esta droga, provocaba un aumento basal de las isoformas pro-apoptóticas de Bcl-x y C9 que impedía el análisis sobre el comportamiento de estos genes en presencia de las citadas polimerasas.

Dado que tanto la isoforma corta de Bcl-x como la larga de C9 favorecen la apoptosis, su aumento luego de la irradiación con luz UV podría ser fisiológicamente relevante para prevenir la posible propagación de mutaciones inducidas por este agente. Las figuras anteriores sugieren que el mecanismo por el cual el UV favorece las isoformas pro-apoptóticas de Bcl-x y C9 es similar al descrito en el capítulo I para la FN e involucra la fosforilación de la pol II. Una característica de este efecto es que tiene lugar en ausencia del factor de transcripción p53, actor principal en la inducción de la apoptosis. Decidimos entonces estudiar los niveles de apoptosis inducidos por la luz UV en células Hep3B utilizando dos marcadores de este proceso: la activación de la caspasa efectora 3 y la unión de anexina V a la fosfatidilserina de la membrana plasmática. En relación a esta última técnica, la fosfatidilserina se ubica, normalmente, en la cara interna de la membrana plasmática pero altera su localización, por *flip-flop*, en respuesta a estímulos apoptóticos. Así, y dado que la anexina V es impermeable a la membrana plasmática, se pueden detectar células apoptóticas por la visualización de células anexina V, acoplada a FITC, positivas.



**Figura R27: La luz UV induce la apoptosis en células Hep3B**

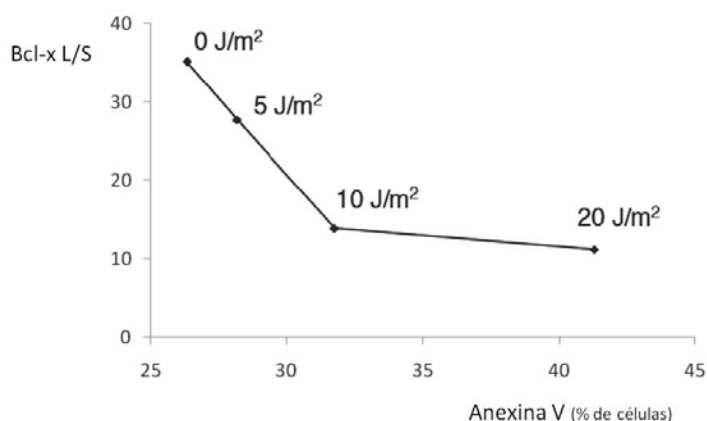
Células Hep3B fueron irradiadas con distintas dosis de luz UV y 20 hs más tarde cosechadas para medir la actividad de caspasa 3 o el porcentaje de células anexina positivas. La actividad de caspasa 3 se expresa como la absorbancia a 415 nm/mg de proteína.

La figura anterior muestra que las células Hep3B son capaces de inducir la apoptosis como lo demuestran los dos métodos utilizados. Dado que los cambios en el AS estudiados aquí son

independientes de la proteína p53, así como la inducción de la apoptosis, decidimos analizar la correlación entre los cambios inducidos por UV en el AS de Bcl-x y el porcentaje de células apoptóticas en función de la dosis de UV.

**Figura R28. La luz UV aumenta el porcentaje de células apoptóticas así como la isoforma pro-apoptótica de Bcl-x**

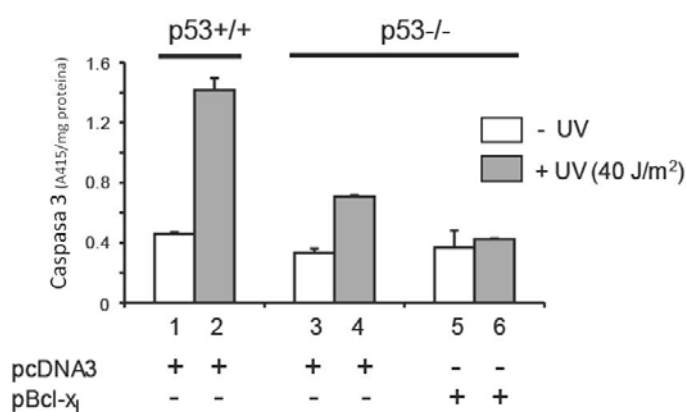
Células Hep3B fueron irradiadas con distintas dosis de luz UV y 20 hs más tarde se analizaron las proporciones pro- y anti-apoptóticas de Bcl-x y el porcentaje de células apoptóticas (anexina V positivas).



Para determinar la causalidad de esta correlación nos preguntamos si la alteración de la relación de isoformas de Bcl-x tendría un impacto en la apoptosis inducida por el UV. Para esto sobre-expresamos la isoforma larga, anti-apoptótica de Bcl-x (Bcl-xL). Para realizar este experimento utilizamos células p53<sup>-/-</sup> dada la alta eficiencia de transfección que éstas poseen y que es, a su vez, necesaria para llevar a cabo este experimento.

**Figura R29. La apoptosis p53 independiente es dependiente de la relación de isoformas de Bcl-x**

Células HCT116 p53<sup>-/-</sup> fueron transfectadas con un plásmido control o con un plásmido de expresión de Bcl-xL. 15 hs más tarde las células fueron irradiadas y 20 hs luego cosechadas para medir la actividad de la caspasa 3.



Así como en células Hep3B, el UV induce la activación de la caspasa 3 en células HCT116 p53<sup>-/-</sup> (calles 3 y 4) aunque en menor medida que en células que expresan este factor (calles 1 y 2). La inducción de la actividad de la caspasa 3 es inhibida por la modificación de las proporciones pro- y anti-apoptóticas de Bcl-x provocada por la sobreexpresión de la isoforma anti-apoptótica, lo que sugiere que el cambio en el AS de Bcl-x es clave en la respuesta apoptótica independiente de p53. A



su vez, la activación de la caspasa 3 en células p53 salvaje también fue afectada por la sobreexpresión de Bcl-xL (resultados no mostrados) pero incluso así se observó una clara activación de caspasa 3. Esto sugiere que en células p53 salvaje hay mecanismos de inducción de la apoptosis independientes de las proporciones Bcl-xL/S.

**Conclusión #9. El cambio en el AS de Bcl-x inducido por la luz UV es clave en la apoptosis p53-independiente**

### Capítulo III

#### La luz ultravioleta y los cambios globales en los patrones de *splicing* alternativo

Para estudiar los cambios en los patrones de AS pero de manera global, y en colaboración con miembros del laboratorio del Doctor Juan Valcárcel (Barcelona, España), estudiamos los efectos de la irradiación UV utilizando un microarreglo diseñado para detectar cambios en AS (*custom splicing-sensitive microarray*, MA) (Figura R30). Para ello células Hep3B fueron irradiadas con 40 J/m<sup>2</sup> y 6 hs más tarde se purificó RNA total, se retro-transcribió, se lo marcó con los fluorocromos Cy3-Cy5 y se realizó la hibridación del MA. Éste posee 1804 eventos de AS (ASE) repartidos en 482 genes humanos con sondas en exones constitutivos, alternativos y en junturas exón-exón.

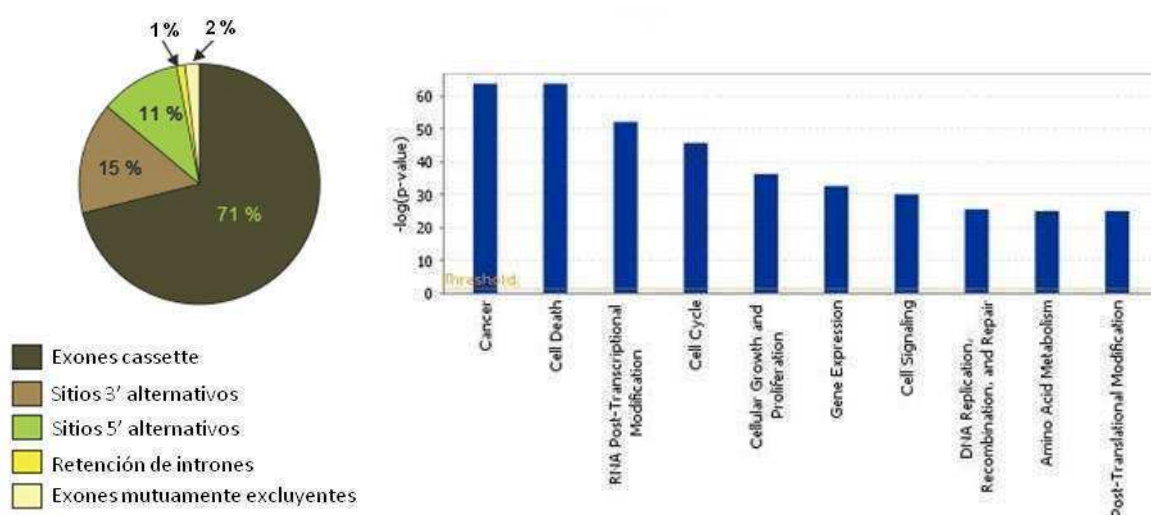
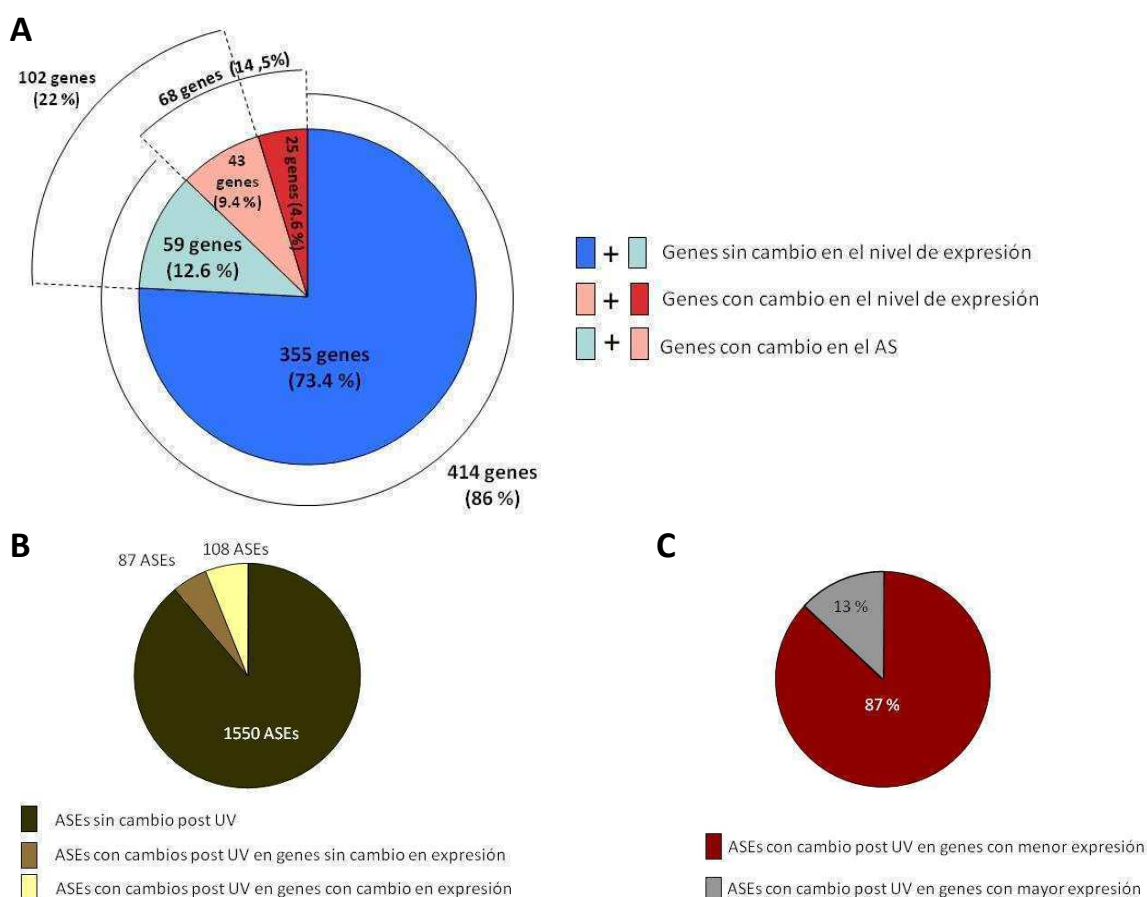


Figura R30. Distribución de los tipos de AS y clasificación funcional de los genes presentes en el MA

El análisis de la hibridación mostró que el 14,5/ (68 genes) de los genes presentes en el MA mostraron cambios en los niveles de expresión. Dentro de este grupo, en el 78/ (53/68 genes) de los genes se detectó una disminución en los niveles de mRNA acumulado, mientras que en el 22/ restante se detectó un aumento en los niveles de mRNA. En relación al AS, aproximadamente el 22/ de los genes (102 genes) mostraron cambios en al menos un ASE en respuesta a la luz UV. Interesantemente, la proporción de genes que cambió al menos un ASE es sustancialmente mayor entre los genes que mostraron cambios en sus niveles de expresión (43/68 genes, 63.2/ ) que entre los genes que no son afectados en su nivel de expresión (59/401 genes, 14.7/ ) (Figura R31.A). Consecuentemente, se observaron más cambios en ASE inducidos por UV dentro del grupo de genes que cambio su nivel de expresión que dentro del grupo de genes que no cambio su nivel de expresión (108 vs. 87) (Fig. R31.B). Por otra parte, la proporción de ASE con cambios post UV es mayor entre los genes que inhiben su transcripción, en detrimento de los que la aumentan, lo que es coherente con el mecanismo descrito en esta tesis (Fig. R31.C).



**Figura R31. Análisis de cambios globales en la transcripción y el AS de células irradiadas con luz UV**

**A.** Distribución de genes que cambian la expresión, el AS o ambos en células Hep3B seis horas luego de la irradiación con UV (40J/m<sup>2</sup>). **B.** Distribución de los ASEs con cambios inducidos por el UV correspondiente a genes que cambian o no su expresión. **C.** Distribución de los ASEs con cambios inducidos por UV en genes con aumento o disminución en su expresión.

Sin embargo, dado que es más probable encontrar disminuciones en los niveles de mRNA acumulado, es esperable encontrar un mayor número de ASE que cambien en respuesta a UV en este grupo. Para relativizar estos datos tomamos el 78/ (53 genes que disminuyen su nivel de expresión) y el 22/ (15 genes que aumentan su nivel de expresión) y calculamos el porcentaje de ASE con cambios inducidos por luz UV dentro de cada grupo. Dentro del grupo de 53 genes que inhibieron su expresión, 37 genes mostraron al menos un cambio inducido por luz UV (69,8/ ) mientras que dentro de los 15 genes que aumentaron su expresión, solo 6 genes mostraron al menos un evento con cambio inducido por el UV (40/ ).

**Conclusión #10. Los cambios en el AS son preferencialmente inducidos dentro del grupo de genes que muestran una menor cantidad de mRNA acumulado en respuesta a UV**

El MA utilizado en este trabajo fue diseñado para analizar en detalle eventos de AS de genes involucrados en cáncer, ciclo celular y proliferación/muerte celular y nuestros resultados muestran que varios ASE de genes pertenecientes a estas categorías cambian en respuesta a UV. Sin embargo pudimos observar un leve enriquecimiento en genes involucrados en ciclo celular, independientemente de su respuesta transcripcional (no se muestra). En relación a los genes particulares estudiados en los capítulos I y II, Bcl-x no está presente en el MA y FN y C9 mostraron los mismos cambios ya sea en la hibridación o en la validación del MA. Por su parte MYC mostro aquí una disminución de su expresión consecuente con lo mostrado en la figura R20.

En el anexo I se puede encontrar más información referida a los ensayos de MA, como por ejemplo la lista de genes con cambios en el AS en respuesta a la luz UV.

## Conclusiones

### Conclusión general

El estrés genotóxico producido por la luz UV promueve cambios en los patrones de *splicing* alternativo, relevantes para las decisiones de vida-muerte de la célula, preferencialmente en el grupo de genes que muestran una menor cantidad de mRNA acumulado. Esto es consistente con la disminución en la tasa de elongación de la pol II debida a la hiperfosforilación de su CTD en respuesta a UV y con el modelo cinético de acoplamiento entre la transcripción y el *splicing* alternativo.

### Capítulo I

- La irradiación de células en cultivo con luz UVC provoca, por *splicing* alternativo, un aumento en la inclusión del exón alternativo EDI tanto para el gen endógeno de la FN humana como para minigenes transfectados transitoriamente.
- El cisplatino produce efectos similares, lo que sugiere fuertemente que el daño al DNA está involucrado en la respuesta.
- El daño del DNA molde no es necesario para observar el efecto de UV sobre el *splicing* alternativo, por lo tanto la señal debe ser propagada.
- Los efectos previamente descritos sobre la inhibición del procesamiento 3' no están involucrados en el efecto del UV sobre el *splicing* alternativo.
- El efecto de la luz UV sobre el *splicing* alternativo del exón EDI es independiente de la vía que involucra al factor de respuesta a estrés p53.
- El efecto de la luz UV sobre el *splicing* alternativo del exón EDI es co-transcripcional.

- El efecto de la luz UV sobre el *splicing* alternativo del exón EDI es dependiente de la hiperfosforilación del dominio carboxilo terminal de la RNA polimerasa II y es imitado por polimerasas mutantes en las cuales los residuos serina 2 o serina 5 han sido reemplazados por ácido glutámico (pol II E2 y E5).
- La luz UV produce una disminución de la tasa de elongación de la pol II y las polimerasas mutantes E2 y E5 presentan también una tasa de elongación reducida.
- En suma, estos resultados son consistentes con el modelo de acoplamiento cinético entre la transcripción y el *splicing* alternativo. Así, la irradiación con luz UV provoca una disminución de la tasa de elongación de la pol II lo que a su vez afecta el AS.

## Capítulo II

- El estrés genotóxico producido por la luz UV o el cisplatino produce un aumento de las isoformas pro-apoptóticas de los mensajeros de Bcl-x y caspasa 9. Este cambio no es el resultado de la degradación diferencial de isoformas sino más bien de cambios en el *splicing* alternativo.
- El tratamiento de células con DRB impide que el UV modifique los patrones de *splicing* alternativo de los genes Bcl-x y caspasa 9, lo que sugiere que estos dos genes también son afectados por el estado de fosforilación de la RNA polimerasa II.
- El efecto de la luz UV sobre el *splicing* alternativo de Bcl-x y caspasa 9 es independiente del factor de respuesta a estrés p53.
- La ausencia de este factor no impide que las células tratadas con luz UV entren en apoptosis siendo esto revertido por la sobreexpresión de la isoforma anti-apoptótica de Bcl-x. Esto pone de manifiesto la relevancia de los cambios en el *splicing* alternativo en la muerte celular.

### Capítulo III

- Los cambios en los patrones de *splicing* alternativo son preferencialmente inducidos dentro del grupo de genes que muestran una menor cantidad de mRNA acumulado en respuesta a UV, siendo esto consistente con el mecanismo de inhibición de la elongación y acoplamiento cinético aquí analizado.

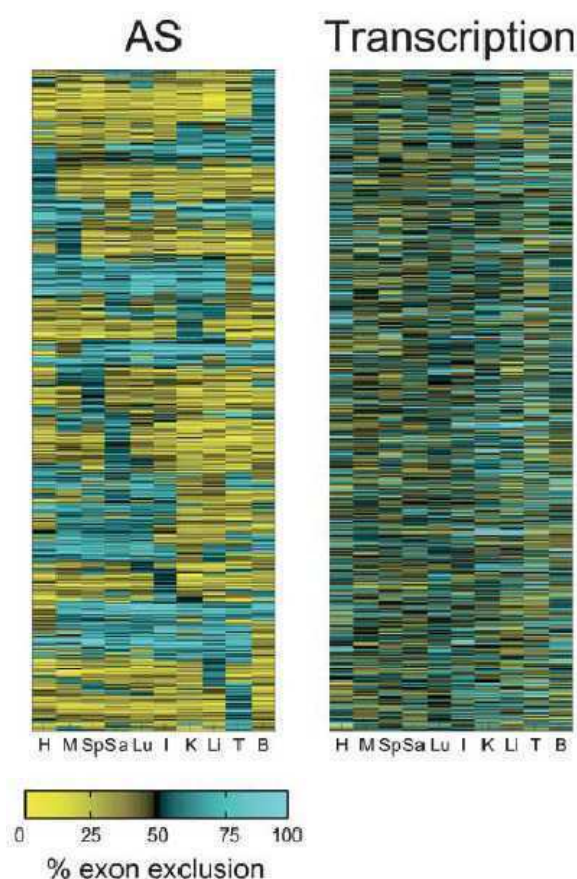
## Discusión

El *splicing* alternativo (AS) es una regla más que una excepción dado que afecta la expresión del 65/ (Kim, Magen et al. 2007) o casi el 90/ (Pan, Shai et al. 2008; Wang, Sandberg et al. 2008) de los genes humanos según diferentes estudios. La importancia del AS no solo es confirmada por la gran cantidad de genes sujetos a este tipo de regulación sino también por hallazgos que muestran que mutaciones que afectan este proceso son frecuentes en enfermedades hereditarias humanas (Caceres y Kornblihtt 2002; Cartegni, Chew et al. 2002; Pagani y Baralle 2004) y que factores regulatorios del AS pueden estar desregulados en cáncer (Karni, de Stanchina et al. 2007). Es claro que el *splicing* puede ser co-transcripcional y que la regulación del AS no sólo depende de la interacción de factores de *splicing*, como las proteínas SR, con sus secuencias blanco en el pre-mRNA sino que también está acoplada a la transcripción por pol II, así como ocurre con otras etapas del procesamiento del pre-mRNA (Maniatis y Reed 2002; Kornblihtt, de la Mata et al. 2004; Bentley 2005). La transcripción puede regular el AS gracias a la interacción de factores de *splicing* con la pol II (acoplamiento por reclutamiento) (de la Mata, Alonso et al. 2003), o por modulación de la tasa de elongación (acoplamiento cinético) (Batsche, Yaniv et al. 2006; de la Mata y Kornblihtt 2006). Los resultados presentados en esta tesis ahondan en el mecanismo de acoplamiento entre transcripción y AS y muestran cómo en una situación de estrés, la transcripción modula el AS.

A lo largo de este trabajo se fueron citando distintas evidencias, algunas más directas que otras, sobre la modulación del AS por parte de la maquinaria transcripcional y más específicamente por la tasa de elongación de la pol II. Sin embargo, no había ninguna evidencia de que el acoplamiento transcripción/AS pudiera actuar en respuesta a una situación particular, como puede serlo el daño al DNA. Claro que la afirmación que surge como conclusión de esta tesis **“la transcripción modula el AS como parte de la respuesta celular al ataque de su material genético”** pone sobre la mesa otra pregunta: ¿cuál es el control de esta afirmación? O dicho de otra manera, ¿“cuánto” del AS en una célula está asociado a la modulación de la transcripción? Como la ciencia está basada en la comparación (sin y con UV por ejemplo) decidimos analizar o comparar otra situación distinta de la analizada en esta tesis para intentar encontrar un **control** que nos permita afirmar que “en condiciones de estrés la transcripción modula el AS” o bien, “la transcripción modula el AS en condiciones de estrés así como en otras condiciones...”. En 2004, un estudio sobre transcripción y AS utilizando *microarrays* (Pan, Shai et al. 2004) reveló que tanto los perfiles globales de transcripción



como los perfiles globales de AS reflejan identidad de tejido. Esto significa que tejidos similares en relación a su función (por ejemplo, los tejidos u órganos del sistema digestivo son más similares entre sí que en comparación con el pulmón) poseen perfiles de transcripción similares así como perfiles de AS similares. O sea, si un tejido expresa una determinada cantidad de un mRNA, es probable que un tejido similar posea también esa cierta cantidad de mRNA mientras que es menos probable que ésta situación se dé al comparar tejidos no relacionados. Por supuesto que ciertos genes harán posible este análisis, mientras que otros de expresión ubicua no serán tan informativos en este sentido. De manera similar, será más probable encontrar que un determinado exón alternativo se incluye en dos tejidos relacionados que en dos tejidos no relacionados. Así, se dice que los perfiles generales de transcripción o de AS reflejan la identidad del tejido.



**Figura D1. Roles independientes del AS y la transcripción en la generación de los perfiles de expresión tejido específicos**

Manteniendo constante el orden de los tejidos en el eje de las "x" (panel AS y panel *Transcription*), los distintos genes (en el eje de las "y") son ordenados según sus patrones de AS (panel izquierdo, AS). Una vez hecho esto, y utilizando las mismas posiciones relativas, se grafican los niveles de mRNA (panel de la derecha, *Transcription*, dónde azul significa niveles altos y amarillo niveles bajos de mRNA acumulado). H, corazón; M, músculo; Sp, bazo; Sa, glándula salivaría; Lu, pulmón; I, intestino; K, riñón; Li, hígado; T, testículos; B, cerebro. Tomado de (Pan, Shai et al. 2004).

La figura D1 muestra que cuando los distintos genes analizados son ordenados según sus patrones de AS, panel izquierdo, no se obtiene ninguna distribución en particular al utilizar este mismo orden pero graficando los niveles de mRNA acumulado (panel derecho). Esto se observa sencillamente porque en el panel izquierdo hay áreas de colores definidos mientras que en el panel de la derecha no. Resultados similares son obtenidos si los genes se ordenan según sus patrones de transcripción y

luego se grafican los niveles de inclusión de los exones alternativos de esos mismos genes. La conclusión de los autores fue que en la generación de los patrones de expresión específicos de tejido, la transcripción (vista como los niveles de mRNA acumulado) y el AS actúan independientemente. El análisis sobre la correlación entre los niveles de mRNA acumulado y los patrones de AS, también gracias a la utilización de *microarrays*, pero en otras situaciones como son la activación de linfocitos T o la comparación de los perfiles de expresión entre humanos y chimpancés (Calarco, Xing et al. 2007; Ip, Tong et al. 2007), arrojó resultados similares a los reportados por Pan y colaboradores: Existen cambios en los niveles de mRNA acumulado (y en la inclusión de exones alternativos) en un linfocito T activado o en uno no activado y existen diferencias entre la cantidad de mRNA acumulado de un cierto gen entre humanos y chimpancés (y también en la inclusión de exones alternativos). Pero los grupos de genes que muestran diferencias en sus niveles de mRNA acumulado entre una condición y otra (un tejido vs otro tejido, un linfocito T activado vs uno no activado y humanos vs chimpancés) **no** son los mismo que muestran diferencias en los patrones de AS. Las conclusiones obtenidas en base a estos tres trabajos difieren de la situación presentada en el capítulo III de esta tesis, en el cuál se observa un claro enriquecimiento de genes con cambios en sus patrones de AS dentro del grupo de genes que también han cambiando su nivel de mRNA acumulado (y en particular dentro del grupo que ha disminuido los niveles). Esta discrepancia (aparente) podría reflejar que los cambios en la transcripción (tal vez mayormente cuantitativos, por ejemplo por prendido o apagado de promotores) que definen la identidad de tejidos no son relevantes para el AS, mientras que los cambios en la tasa de transcripción, a través de la inhibición de la elongación, parecen ser relevantes para el AS por ejemplo en situaciones de estrés por daño al DNA. Por supuesto no podemos, ni queremos, descartar que en otra situación sea también aparente el acoplamiento entre la transcripción y el AS pero seguro que este acoplamiento no depende, al menos sencillamente, de los niveles de transcripto acumulado o de la fuerza del promotor, en concordancia con resultados publicados por nuestro grupo hace 12 años (Cramer, Pesce et al. 1997).

Cabe aclarar que los resultados mostrados en esta tesis sobre la correlación observada entre genes que han disminuido sus niveles de mRNA acumulado y aquellos que presentan cambios en el AS, junto a la posterior interpretación sobre la consistencia entre éstos resultados y el modelo cinético de acoplamiento (basado en una menor tasa de elongación, como la que se obtiene al irradiar células) es justamente eso, una interpretación. Los niveles de mRNA acumulado no sólo pueden disminuir por una menor tasa de elongación sino también por una menor tasa de iniciación o una mayor tasa de degradación. Sin embargo, y en favor de nuestras conclusiones, los niveles absolutos

de mRNA (tal vez mayormente asociados a la tasa de iniciación) no parecen afectar los patrones de AS como fue discutido más arriba y, al menos para los genes particulares estudiados en éste trabajo (FN, Bcl-x y C9), la degradación no parece estar relacionada.

Por último, es imposible saber, al menos por ahora, cuántos de los genes que mostraron cambios en el AS y disminuyeron la cantidad de transcripto acumulado, lo hicieron sin afectar su tasa de elongación. Éstos casos podrían representar falsos positivos en nuestro sistema, ya que nosotros mismos demostramos que pueden existir cambios en el AS sin observar cambios aparentes en los niveles de mRNA acumulado (capítulo III). Para terminar de complejizar el análisis, podríamos tener también falsos negativos (genes que aparentemente no cambiaron la cantidad de mRNA acumulado y sí el AS), por ejemplo porque la sensibilidad de la técnica no permita detectar cambios en los niveles de mRNA por debajo de un umbral, por mensajeros de vida media muy superior a las 6 horas que transcurrieron entre la irradiación y el cosechado de las células o por una modulación particular de las tasas de iniciación y elongación.

Como se comentó en Resultados, el *microarray* fue diseñado para estudiar eventos de AS de genes involucrados en ciclo celular, apoptosis, etc y de hecho se observaron cambios en genes involucrados tanto en el control del ciclo celular como en el control de la apoptosis. Éste es un punto de gran estudio ya que no está del todo claro cuándo o cómo una célula decide frenar el ciclo en respuesta al daño en el DNA o bien inducir el proceso apoptótico. Interesantemente, tanto genes como p21 involucrados en el arresto (el cual inhibe la acción de CDK2/CDK4 y la progresión a través del ciclo) o genes involucrados en el proceso apoptótico, como los mencionados anteriormente, son inducidos por UV y se ha sugerido que los involucrados en el arresto del ciclo son inducidos preferencialmente, aunque esto puede depender del tipo celular o el tipo de daño (Espinosa, Verdun et al. 2003). Es más, en la misma línea celular se puede obtener arresto del ciclo o apoptosis, en respuesta a distintos estímulos pero en ambos casos mediados por el factor de transcripción p53. Esto pone de manifiesto, independientemente del rol de p53, que las respuestas transcripcionales distan de ser sencillas, incluso cuando el mismo factor de transcripción está involucrado (Espinosa 2008). A su vez, se ha propuesto que la violencia del estímulo provoca respuestas transcripcionalmente distintas las que, en definitiva, llevan al arresto del ciclo (por ejemplo por una baja dosis de UVC) o a la inducción de la apoptosis (por una alta dosis de UVC) (Gentile, Latonen et al. 2003). En este sentido sería interesante estudiar el efecto de la luz UV sobre el acoplamiento transcripción/AS en las distintas etapas del ciclo celular y analizar en paralelo el arresto del ciclo o la

inducción de la apoptosis. Tal vez de ésta manera se contribuya a la comprensión de los factores involucrados en decisiones tan disímiles.

En el capítulo II fueron analizados dos de los reguladores principales de la respuesta a estrés, Bcl-x y C9. El análisis de la regulación del AS de estos genes resulto ser más difícil que el de EDI. Si bien observamos una correlación entre el grado de fosforilación de la pol II (hiperfosforilación necesaria y suficiente para observar cambios al menos en EDI) y los cambios en el AS de estos dos genes y mostramos por otra parte que, no sólo el DRB (el cual también produce una inhibición de la elongación) afecta los niveles basales sino que el UV es incapaz de modificar el AS en células tratadas con DRB, alguno de los experimentos que realizamos para EDI fueron de difícil interpretación para Bcl-x y C9. Este grado adicional de complejidad con el que nos encontramos creemos se debe a que son, justamente, genes de respuesta a estrés y muchos de los experimentos que realizamos para EDI implican un estrés celular. Por ejemplo, al transfectar transitoriamente las polimerasas mutantes E2/E5/A2A5 para analizar la respuesta de Bcl-x/C9 nos encontramos con que el mero agregado de  $\alpha$ -amanitina (incluso en presencia de una pol II WT resistente a la droga) ya provocaba cambios en los patrones de AS de estos genes dificultando el análisis de los resultados. Del mismo modo, al intentar obtener clones estables para estas polimerasas nos encontramos, análogamente a lo que había ocurrido para la pol II C4 tiempo atrás, que los pocos clones estables obtenidos expresaban una baja cantidad de la polimerasa mutante en cuestión, posiblemente indicando la inviabilidad de células con este tipo de mutaciones. Al ser genes de respuesta a estrés y con papeles tan determinantes en la apoptosis es dable suponer que estarán regulados por múltiples vías, entre las cuales algunas pueden involucrar al estrés transcripcional mientras que otras no. Se ha descrito que la modulación del AS de Bcl-x puede depender de las vías de PKC (Revil, Toutant et al. 2007); de ceramidas (Chalfant, Rathman et al. 2002); de la fosfatasa de serinas/treoninas PP1 (Boon-Unge, Yu et al. 2007), a su vez involucrada en la regulación del estado de fosforilación de proteínas SR (Misteli y Spector 1996); y de la proteína SR SC35 (Merdzhanova, Edmond et al. 2008). En ninguno de estos trabajos se irradiaron células con luz UV ni se las trató con cisplatino (de hecho ésta tesis es, hasta donde sabemos, el primer trabajo que muestra cambios en Bcl-x y C9 en respuesta a UV/cisplatino) y ninguno de los agentes utilizados han demostrado provocar una hiperfosforilación del CTD inhibible por DRB. Sin embargo, el estrés transcripcional utilizado en éste trabajo es sólo una de las múltiples formas de agresión celular, por lo que es lógico suponer que distintos agentes activen distintas cascadas de señalización las cuales, en definitiva, podrían converger en la modulación del AS de Bcl-x y C9. En nuestro sistema, dónde los cambios en el AS de Bcl-x/C9 son independientes de p53, la apoptosis inducida por la luz UV en células p53<sup>-/-</sup> fue revertida gracias a la

sobreexpresión de la isoforma anti-apoptótica de Bcl-x, demostrando que este mecanismo de muerte celular puede ser modulado directamente por cambios en los patrones de AS de genes apoptóticos. Así, en el estudio de las vías de muerte independientes de p53 habrá que prestar atención no sólo a p63, p73, etc, sino también, como lo sugiere esta tesis, al acoplamiento transcripción/*splicing*.

### ¿Y dónde está la especificidad de la respuesta?

Un aspecto interesante de la respuesta al daño en relación al procesamiento de los pre-mRNAs es la especificidad. Es claro que hay genes que responden transcripcionalmente a la irradiación con luz UV y genes que no. No todo parece ser tan sencillo como lo sugieren los *western blots* en los cuales se detecta un claro aumento en la proporción de pol II O. Como se comentó en la Introducción, un mecanismo de inhibición del procesamiento 3' ha sido propuesto en respuesta a la irradiación con luz UV. Éste ha sido interpretado como una respuesta que facilita la reparación del daño por degradación de la pol II gracias a la actividad E3 del complejo BRCA-1 y BARD-1 e inhibe el procesamiento de mensajeros con potenciales mutaciones (Kleiman, Wu-Baer et al. 2005). Si bien otras interpretaciones son posibles, este trabajo puso de manifiesto la importancia de estudiar cómo el procesamiento de los pre-mRNAs es modulado en respuesta al daño, o dicho de otra manera, cómo distintas opciones de procesamiento del pre-mRNA modulan al daño. Una predicción de estos trabajos (el presente y (Kleiman, Wu-Baer et al. 2005)) es que la inhibición del procesamiento 3' no debe ser general, sino más bien debería afectar a un grupo de genes entre los cuales no deberían figurar aquellos requeridos para la respuesta celular al daño, como por ejemplo genes involucrados en la reparación, en el ciclo celular o en la apoptosis (Bcl-x o C9 por ejemplo). La pregunta del millón es dónde reside la especificidad, cómo es que algunos genes modulan su transcripción, su AS y tal vez su procesamiento 3' en respuesta a un daño genotóxico y otros no. Es lógico suponer que haya genes “marcados” para responder ante una situación particular, pero, dado el acoplamiento que existe en las distintas etapas de la expresión, esta marca puede involucrar a componentes de la maquinaria transcripcional, de la maquinaria de *splicing* o de ambas. Así, las “marcas” o características de los genes de respuesta a estrés podrían ser secuencias particulares en su promotor, en sus regiones internas, características del contexto cromatínico, elementos de respuesta a factores en *trans*, etc. De hecho, como fue mostrado en esta tesis y comentado en la Introducción para p21, es claro que al menos ciertos genes son capaces de formar un PIC con una pol II hiperfosforilada. Dicho de otra manera, los complejos transcripcionales no parecen ser los mismos

en presencia o ausencia de daño. De hecho, al menos en levaduras, los genes de respuesta a estrés parecen estar regulados de manera diferente. En *S. cerevisiae* hay dos complejos relacionados capaces de inducir el ensamblado del PIC gracias a la modificación de la cromatina y la unión de TBP (*TATA binding protein*) a su secuencia en el DNA: el complejo SAGA y el complejo TFIID. Estudiando la ocupación de promotores a nivel global, se ha encontrado que en los genes de respuesta a *heat shock* la transcripción es llevada a cabo por el complejo SAGA, mientras que los genes reprimidos en ésta situación son regulados por TFIID (Zanton y Pugh 2004). De hecho, la relocalización de P-TEFb en los cromosomas politénicos de *D. melanogaster* en respuesta a *heat shock* claramente demuestra que estos genes, tal vez en detrimento de otros, serán transcritos. La gran cantidad de factores auxiliares de la transcripción encontrados en mamíferos hace posible este escenario que deberá ser investigado apropiadamente (Levine y Tjian 2003; Muller, Demeny et al. 2007). La composición de la maquinaria transcripcional, sus propiedades y el efecto sobre el procesamiento del pre-mRNA son preguntas que deben ser aún atendidas. Cuáles son los factores de elongación, u otros factores celulares, que producen una disminución de la elongación en respuesta a UV o cuán general es la inhibición de la elongación, son algunas de las preguntas generadas por este trabajo.

### **Hiperfosforilación vs hipofosforilación. UV vs DRB.**

La hiperfosforilación del CTD en respuesta al daño puede ser la consecuencia de la activación de diferentes quinasas como CDK-7, CDK-9 u otras. Hemos mostrado (Figuras R13 y R18) que el uso del DRB previene la hiperfosforilación así como el efecto del UV sobre el AS, al menos sobre minigenes en HCT116, por lo que, la o las quinasas involucradas en el efecto son inhibibles por DRB. El DRB fue originalmente descrito como un inhibidor de CDK-9 pero su especificidad fue puesta luego en duda. A favor de que el efecto de la luz UV esté mediado por CDK-9 está el hecho de que trabajos previos han demostrado que la luz UV provoca la activación de CDK-9 por inducir la disociación del pequeño RNA inhibitorio 7SK del complejo P-TEFb (Nguyen, Kiss et al. 2001). Si este fuese el caso, el experimento de DRB sugiere que la fosforilación en serina 5 observada luego del tratamiento con luz UV puede deberse a CDK9, en concordancia con resultados que muestran que CTDK-I, el homólogo de levaduras de CDK-9, fosforila *in vitro* tanto serina 2 como serina 5, con la única condición de que la otra serina, en la misma héptada, esté fosforilada (Jones, Phatnani et al. 2004). En relación a esto, trabajos realizados en el laboratorio del Doctor Jean Marc Egly, en Estrasburgo, Francia, sugieren que CDK-7 no estaría involucrada en la hiperfosforilación del CTD en respuesta al tratamiento con luz UV. Recientemente han demostrado que el UV induce la disociación de CAK (CDK-7/ciclinaH/MAT1)

del resto del complejo TFIIH. El complejo TFIIH sin CAK es reclutado a la lesión y la reanudación de la transcripción coincide con la formación del complejo TFIIH conteniendo CAK (Coin, Oksenyich et al. 2008). A su vez, estudios previos mostraron que, al menos *in vitro*, el CTD no es buen sustrato del CAK pero si del complejo TFIIH entero. Así, sería poco probable que en respuesta a UV CDK-7, como parte del CAK, fosforile el CTD en serina 5. Para intentar identificar a las quinasas responsables utilizamos siRNAs específicos contra CDK-7, CDK-8 y CDK-9. Lamentablemente, si bien observamos una clara reducción (50% como mínimo) en los niveles proteicos de estas enzimas, no solo no observamos ningún efecto sobre el AS de EDI (ni en el basal ni en el tratado con UV) sino que tampoco observamos modificaciones en los niveles de fosforilación de la pol II. La posibilidad más sencilla sería que el nivel de *knock-down* alcanzado sea insuficiente. Sin embargo, y para evitar este tipo de complicaciones, otro grupo delecionó el gen de CDK-7. Al realizar *westerns* de extractos obtenidos de éstas células notaron una migración de la pol II retrasada en relación a células normales y fosforilada en serina 5. Esto confirma que múltiples quinasas pueden fosforilar este residuo pero también que, probablemente, no todas lo hacen de la misma manera (recordemos que en humanos hay 52 serinas 5) ya que éstas células mueren, consistentemente con una transcripción alterada, al cabo de algunas generaciones (Larochelle, Merrick et al. 2007). Sin embargo y gracias a la “inespecificidad” del DRB pudimos concluir que la fosforilación del CTD es necesaria para observar el efecto de la luz UV sobre el AS.

Interesantemente, mientras la luz UV y el DRB tienen efectos opuestos sobre la fosforilación del CTD, ambos inhiben la elongación de la pol II *in vivo* (ésta tesis y (Darzacq, Shav-Tal et al. 2007)). Una posible especulación es que en situaciones de hiper (UV) o hipofosforilación (DRB) persistente el efecto sobre la transcripción sea similar por interferir con el ciclo de fosforilación/de-fosforilación necesario para una regulación concertada de la iniciación, elongación, terminación y re-iniciación de la transcripción. Una explicación alternativa es que el CTD tenga, al menos, dos estados de hiperfosforilación inhibibles por DRB. Es concebible que el estado de hiperfosforilación que disminuye la elongación, como el provocado por el UV e imitado por las mutantes E2-E5, difiera del estado de hiperfosforilación de células no irradiadas característico de una pol II elongadora. De hecho, las bandas de pol II O, como las mostradas en los *westerns* de esta tesis, no necesariamente contienen una población homogénea de moléculas. Los patrones de fosforilación de CTD individuales pueden variar de una molécula a otra por, por ejemplo, fosforilación diferencial de las serinas en posición 2 ó 5 o por fosforilación diferencial de las 52 repeticiones del CTD, como fue especulado previamente en células CDK-7 *-/-*. Desafortunadamente, los métodos actuales no permiten identificar estos patrones inequívocamente (Phatnani y Greenleaf 2006). En cualquier



caso, los resultados aquí presentados muestran que los reemplazos serina 2 o serina 5 por ácido glutámico son suficientes para disminuir la elongación sugiriendo que un patrón homogéneo de fosforilación, dado que todas las héptadas contienen la mutación, en cualquiera de las dos serinas modula la elongación. Estos resultados ponen de manifiesto un escenario más complicado que el actualmente aceptado en el cual la fosforilación de serina 5 ó 2 son marcadores de iniciación y elongación respectivamente. Así, está claro que en presencia de una pol II hiperfosforilada (ya sea por UV o imitada por las mutantes E2/E5) o hipofosforilada (DRB o A2A5), el PIC se puede formar y en ambos casos la elongación está disminuida. Sin embargo, desconocemos los factores que en uno u otro caso impactan sobre las propiedades catalíticas de esta enzima. Por ejemplo, mientras la inhibición de la elongación por tratamiento de células Hep3B con DRB causa un aumento en la inclusión de EDI (Nogues, Kadener et al. 2002), el mismo tratamiento, pero en células HCT116, provoca un aumento en la inclusión casi despreciable, lo que sugiere que la presencia o el estado de distintos factores involucrados en este efecto puede variar en distintas líneas celulares.

### **De la lesión al acoplamiento. Un camino largo.**

¿Cuál es la conexión entre las lesiones causadas por el UV y los cambios en los patrones de AS?

¿Es el calcio? El grupo de Zhou ha sugerido que esta puede ser una de las claves al mostrar que la liberación de P-TEFb del complejo que contiene al pequeño RNA inhibitorio 7SK está regulada por vías de señalización que involucran la liberación de calcio y la acción de las fosfatasa PP2B y PP1 $\alpha$ . Sin embargo mucho trabajo resta por hacer en éste campo (Chen, Liu et al. 2008).

¿Es el sistema de reparación? Típicamente el NER reconoce la lesión. Interesantemente, la lesión *per se* no parece explicar la respuesta transcripcional dado que 50 J/m<sup>2</sup> provocarían, aproximadamente, una lesión en cada uno de los genes de la célula. Sin embargo la inhibición transcripcional es de sólo el 10% de los genes (en concordancia con nuestros resultados) (Gentile, Latonen et al. 2003). Esto deja algunas enseñanzas. Por una lado sobre la (alta) eficiencia del sistema de reparación. Y por otro lado, que probablemente la inhibición de la transcripción se deba a la propagación de la señal de daño en *trans* (de manera análoga a lo que ocurre para el AS dónde el daño en *cis* no es necesario). Esto sugiere un acoplamiento entre los sistemas de reparación y transcripción el cuál de hecho fue descubierto hace años (¡y no por realizar razonamientos como este!). Como se ha discutido brevemente, el factor general de la transcripción TFIIF está involucrado tanto en la reparación del



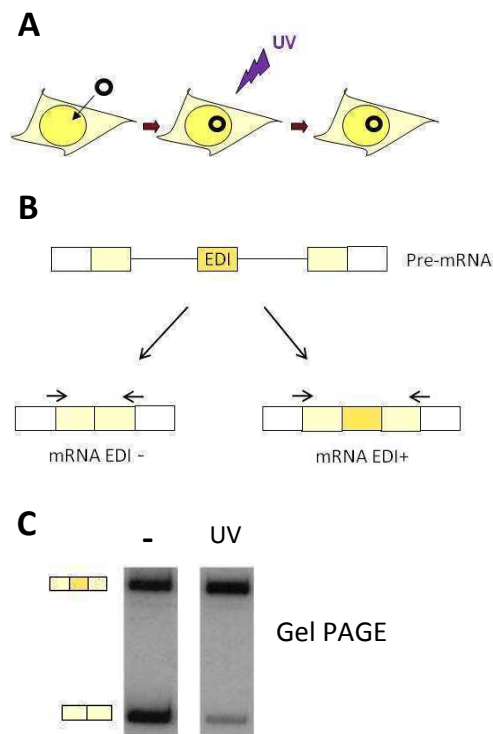
daño inducido por UV cómo en la transcripción (Drapkin, Reardon et al. 1994) y contiene subunidades (proteínas XP por ejemplo) que participan en ambos procesos. Estos descubrimientos ayudaron a entender las bases moleculares de ciertas enfermedades deficientes en el sistema de reparación como *xeroderma pigmentosum* (XP) o *cockayne syndrome* (CS), las cuales están asociadas a una extrema sensibilidad a agentes de daño, en particular al UV. Así, mutaciones en los genes XP se asociaban a un sistema de reparación (NER) deficiente. Sin embargo, la severidad de la citotoxicidad inducida por el UV no podía ser explicada sólo en términos de un sistema de reparación defectuoso (van Hoffen, Balajee et al. 2003). De ésta manera, fue cada vez más quedando en claro que factores de reparación cumplían funciones en la transcripción (o viceversa) y que las complicaciones asociadas a las enfermedades arriba citadas no eran únicamente producto de un sistema de reparación defectuoso, sino también de un sistema de transcripción defectuoso. Por lo tanto, el estudio de los patrones de AS de estos pacientes puede tal vez, gracias al acoplamiento transcripción/AS aquí estudiado, ayudar a dilucidar nuevos aspectos moleculares relacionados con esas enfermedades.

## Materiales y Métodos

### Experimento tipo

El *splicing* alternativo de EDI puede ser reproducido eficientemente en transfecciones transitorias de líneas celulares con minigenes híbridos compuestos por un fragmento de 3 kb que abarca a EDI con sus intrones flanqueantes y parte de sus exones vecinos, insertado en el exón 3 del gen de  $\alpha 1$ -globina (Vibe-Pedersen, Kornblihtt et al. 1984). Esto permitió demostrar que EDI posee un ESE rico en purinas con la secuencia GAAGAAGAC capaz de unirse a proteínas SR que estimulan al sitio 3' débil de EDI (Lavigne, La Branche et al. 1993; Caputi, Casari et al. 1994), y un elemento exónico río abajo del ESE que regula negativamente la inclusión de EDI a través de afectar la estructura secundaria del RNA y la disponibilidad del ESE (Muro, Chauhan et al. 2003; Buratti, Muro et al. 2004). A lo largo de esta tesis se han realizado diversas técnicas, pero la más comúnmente utilizada fue la mencionada transfección transitoria de minigenes reporteros de AS conteniendo el exón EDI y algún promotor, constitutivo o inducible (Figura M1).

**Figura M1. Experimento tipo**



**A.** De manera general, las células son transfectadas y luego irradiadas o no como control. Tiempo después las células son cosechadas y el RNA purificado para realizar una reacción de retro-transcripción. El cDNA así obtenido es utilizado en una reacción de PCR. **B.** A partir del minigén un pre-mRNA es sintetizado el cual puede o no incluir al exón EDI una vez procesado. Los *primers* (flechas) usados en la PCR radioactiva anclan sobre secuencias híbridas globina (cuadrados blancos)/fibronectina (cuadrados amarillo claro y oscuro). Así, los mensajeros endógenos de globina o fibronectina no son amplificados. **C.** Los productos de PCR son separados en un gel no desnaturante, las bandas recortadas y cuantificadas. En éste ejemplo, en células no irradiadas, la radioactividad de la banda que contiene EDI es similar a la que no lo contiene. Por lo tanto la relación entre ellas será 1. En células irradiadas esta relación es de, aproximadamente, 8. Así, diremos que el efecto de UV fue de 8 veces. Éste será el tipo de análisis que haremos a lo largo del trabajo. Las relaciones absolutas (1 en el control y 8 en UV) no serán tenidas en cuenta ya que estas varían por parámetros que no necesariamente son de interés, como el tiempo post-UV al que se cosechó, el promotor utilizado, etc. Por último, en la mayoría de los experimentos se irradió con 40 J/m<sup>2</sup>. La variación en la dosis usada en algunos experimentos corresponde a condiciones particulares como el estado de confluencia de las células, el tiempo post-UV de cosechado o el uso de distintas drogas, intentando siempre evitar una muerte masiva.

Si en un determinado experimento se indica que se utilizó un minigén reportero de AS con promotor constitutivo como  $\alpha$ -globina-EDI o FN-EDI (esto es, que no requiere de la co-transfección de un activador transcripcional) típicamente se transfecta el minigén y 4 horas más tarde, al cambiar el medio de transfección por medio completo, se irradian las células las cuales serán cosechadas, a no ser que se indique lo contrario, 10 a 12 horas más tarde. Si en cambio se utiliza el minigén reportero de AS Tet-EDI, se co-transfecta el minigén con el activador transcripcional reprimible por tetraciclina tTA-VP16 (deriva del sistema Tet-off como se detalla más abajo y posee un promotor constitutivo) en presencia de tetraciclina. Cuatro horas más tarde se cambia el medio de transfección por medio completo con el agregado de tetraciclina. Aproximadamente 12 horas más tarde (tiempo suficiente para que tTA-VP16 se exprese pero en condiciones de represión de la transcripción del minigén Tet-EDI) se irradian las células y se agrega medio completo sin tetraciclina para inducir la transcripción del reportero de AS pero únicamente en condiciones de estrés.

## **Plásmidos**

### **Minigenes reporteros de *splicing* alternativo**

- pSVEDATot (llamado comúnmente  $\alpha$ -globina-EDI) contiene el exón alternativo EDI de la Fibronectina (FN) humana bajo el control del promotor de la  $\alpha$ -globina humana (Caputi, Casari et al. 1994).
- pSVEDA/FN (llamado comúnmente FN-EDI) contiene el exón alternativo EDI de la FN humana bajo el control del promotor de la FN humana (Cramer, Pesce et al. 1997).
- pUHC-EDA (llamado comúnmente Tet-EDI, o EDI inducible/reprimible ya que la transcripción de éste minigén, en presencia de tTA-VP-16 es reprimida por el agregado de tetraciclina) se obtuvo en el laboratorio a partir de pUHC13-3 (Gossen and Bujard 1992). Para ello se removió el gen de Luciferasa presente en este vector y se lo reemplazó por el fragmento BssHII/PvuII de 3899 pb de pSVEDATot que contiene el exón EDI y parte de sus exones flanqueantes río arriba y río abajo del mismo.
- pUHC-EDA delta Poli A es la versión mutante para el sitio de poliadenilación del minigén inducible. El reportero de luciferasa en pUHC 13-3 fue removido reemplazado con el fragmento de 3743 pb obtenido por digestión con BssHII/BglI del plásmido pSVEDA. Este fragmento contiene el exón EDI y parte de sus exones flanqueantes río arriba y río abajo. Este minigén es idéntico a pUHC-EDA pero carece un fragmento de 163pb el cual contiene el sitio de poliadenilación.

- pUHD 15-1 (tTA-VP16) expresa una fusión entre el represor procariota tet y el dominio de transactivación ácido C-terminal (aa 363-490) de VP16 del virus herpes humano (Gossen and Bujard 1992).

### **Plásmidos de expresión de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II**

Los siguientes vectores de expresión para la subunidad mayor de pol II fueron gentilmente cedidos por el Dr. David Bentley de la Universidad de Colorado:

- pAT7Rpb1 $\alpha$ Amr (Nguyen, Giannoni et al. 1996) (llamado comúnmente pol II WT resistente) expresa la subunidad mayor (hRpb1) de la pol II humana con una mutación puntual (N792D) que confiere resistencia a  $\alpha$ -amanitina.
- pAT7Rpb1 $\alpha$ AmrR749H (pol II lenta o hC4) es un derivado de pAT7Rpb1 $\alpha$ Amr con una mutación en el codón 749 de hRpb1 (CGT a CAG), que produce el cambio de un único amino ácido (R749H) de modo equivalente a la mutación C4 de *Drosophila* (R741H) (Coulter and Greenleaf 1985).
- hRpb1 (YSPTSPS)27+WT Cter (Fong et al.2003)– y seleccionando clones aislados con diferente número de repeticiones, que se originaron posiblemente a partir de eventos de recombinación durante la división celular (ver secuencias de CTD en Figura 28).
- Las variantes E2, E5 y A2A5 fueron realizadas en el laboratorio del doctor Bentley reemplazando las serinas en posición 2 o 5 por ácido glutámico o por alaninas.

### **Transformación bacteriana, *minipreps*, *maxipreps***

#### **Transformación de bacterias**

Para generar bacterias competentes se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*, y un protocolo tradicional basado en CaCl<sub>2</sub> y otras sales. Con este protocolo, se generan bacterias con una eficiencia de aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC/ $\mu$ g. Estas bacterias fueron transformadas según métodos convencionales basados en el protocolo de Hanahan (Hanahan 1983).

#### **Preparación de plásmidos a pequeña escala (*minipreps*)**

Se utiliza esta técnica para producir una pequeña cantidad de plásmido a partir de un cultivo bacteriano de unos pocos ml, con el objetivo de, por ejemplo, chequear mediante mapeo de restricción o secuenciación si los clonados realizados habían generado el plásmido de interés. No se detalla esta técnica debido a que es realizada en cualquier laboratorio de biología molecular.

**Preparación de plásmidos a gran escala (*maxipreps*)****Por columna (Qiagen)**

Las columnas de intercambio aniónico de Qiagen permiten obtener unos 100 µg de DNA plasmídico (columnas tip 100) o 500 µg (columnas tip 500). Se realiza el protocolo siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

**Por gradiente de cloruro de cesio**

Con este protocolo se pueden obtener 5-10 mg de plásmido a partir de 500 ml de un cultivo saturado de *E. coli* que creció toda la noche en agitación en medio rico (*Terrific broth*) en presencia del antibiótico de selección.

**Cuantificación de los plásmidos**

Para conocer la concentración aproximada, los plásmidos fueron cuantificados en todos los casos con un espectrofotómetro (*GeneQuant*) que mide la absorción a 260 nm (ultravioleta). Luego, las concentraciones fueron ajustadas corriendo alícuotas en un gel de agarosa con bromuro de etidio y comparando con estándares de masa.

**Líneas celulares****Mantenimiento de las líneas celulares**

Para las transfecciones transitorias realizadas en esta tesis se utilizaron células de las líneas, Hep3B, HCT166 salvaje y HCT116 p53<sup>-/-</sup>. Las dos líneas HCT116 fueron gentilmente cedidas por la Doctora Vanesa Gottifredi del Instituto Leloir. Las líneas celulares fueron mantenidas en placas de plástico de 10 cm de diámetro con medio completo, en un incubador para células con temperatura controlada (37 °C) y en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. El medio completo consiste en D-MEM baja glucosa (Invitrogen) para Hep3B o el mismo medio pero con un suplemento de ácido pirúvico (Invitrogen), a los cuales se les agrega 10% v/v de suero fetal bovino y antibióticos (100 U/ml final de penicilina y 100 µg/ml final de estreptomicina). Ocasionalmente, si se quiere utilizar el medio completo con posterioridad a las dos semanas de preparación, se agrega también L-glutamina en una concentración final de 2,9 g/ml. Cuando las células alcanzan una confluencia del 80%, se aspira el medio de cultivo, se realiza una lavado con PBS y se coloca 1 ml de tripsina 2,5% p/v. Luego de incubar a 37 °C por unos pocos minutos, se detiene la reacción por agregado de medio completo, se replaquea un cierto volumen (1/4 a 1/8 para Hep3B y 1/10 a 1/20 para HCT) a una nueva placa de plástico de 10 cm y se lleva a 10

ml de volumen final con medio completo. Las células son congeladas en N<sub>2</sub> líquido y descongeladas siguiendo protocolos convencionales. Para más información ver <http://www.atcc.org>.

### **Transfecciones**

#### **Transfección de células Hep3B:**

El día anterior a la transfección se plaquean 200.000 células en un pocillo 3,5 cm de una placa de 6 pocillos. La transfección se realiza con Lipofectamina (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. La cantidad de plásmido total transfectado se ajustó a 2 µg para una cantidad de 6 µL de lipofectamina. Cuando se co-transfectaron minigenes junto con vectores de expresión de variantes de pol II se mantuvo una relación molar mínima de hRpb1:minigén de 4:1. Cuando se co-transfectaron minigenes inducibles con transactivadores tTA, se mantuvo una relación molar tTA:minigén de 10:1 según descrito previamente (Gossen and Bujard 1992).

#### **Transfección de células HCT116:**

Dos días antes de la transfección se plaquean 400.000 células en un pocillo 3,5 cm de una placa de 6 pocillos. La transfección se realiza con Lipofectamina (Invitrogen) o Lipofectamina2000 (Invitrogen) en aquellos experimentos en los que una alta eficiencia de transfección (>80%) es requerida, siguiendo las indicaciones del fabricante. La cantidad de plásmido total transfectado se ajustó a 2 µg para una cantidad de 6 µL de lipofectamina o lipofectamina2000. De la misma manera que en Hep3B, cuando se co-transfectaron minigenes junto con vectores de expresión de variantes de pol II se mantuvo una relación molar mínima de hRpb1:minigén de 4:1 y cuando se co-transfectaron minigenes inducibles con transactivadores tTA, se mantuvo una relación molar tTA:minigén de 10:1.

### **siRNAs**

En los experimentos de RNAi, se transfectaron 500 ng de siRNA doble cadena por pocillo de 3,5 cm. De manera general, una vez transfectados los siRNAs, se esperó entre 48 y 72 hs para irradiar las células. Las secuencias de los siRNAs utilizados son las siguientes (sólo se muestra la secuencia sentido): Luc (siRNA contra Luciferasa GL3) 5'- CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3'. BRCA1 (siRNA contra BRCA1) 5'-NNGGAACCUGUCUCCACAAAGUU-3'. BARD1 (siRNA contra BARD1) 5'-NNCAGUAACAUGUCCGAUGAAUU-3'

## Tratamientos

### Irradiación con luz UVC (254 nm):

La irradiación con luz ultravioleta fue realizada utilizando un *CL-1000 ultraviolet crosslinker (UVP)*. Antes de la irradiación, el medio de cultivo fue removido y el excedente fue lavado con buffer PBS. El PBS es luego aspirado y la irradiación fue realizada en seco. La irradiación con 40 J/m<sup>2</sup> toma sólo unos 5 segundos. El medio de cultivo completo fue re-agregado inmediatamente después de la irradiación.

### $\alpha$ -amanitina:

En los experimentos transfección con minigenes reprimibles por tetraciclina y distintas versiones de la pol II, las células fueron co-transfectadas con el transactivador controlado por tetraciclina (tTA-VP16) y el minigén reportero Tet-EDI. La transfección se realizó en presencia de tetraciclina (1 µg/mL) la cual también se agregó una vez cambiado el medio de transfección. Luego de 12 a 18 hs post-transfección las células fueron pre-tratadas con  $\alpha$ -amanitina (5-10 µg/mL) para detener la transcripción por la pol II endógena. Diez horas más tarde las células fueron irradiadas y la transcripción inducida por medio de dos lavados con PBS, para eliminar la tetraciclina, y posterior agregado de medio sin tetraciclina pero conteniendo  $\alpha$ -amanitina. Quince a veinte horas más tarde las células fueron cosechadas.

## Análisis y preparación de RNA

Para purificar RNA de células adherentes en cultivo se utilizó Trizol (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante. Así se obtienen aproximadamente 5 a 10 µg de RNA a partir de un pocillo de 3,5 cm de diámetro. Una vez obtenido el *pellet* de RNA se resuspende en 20 µl de agua y se congela a -80°C. Para resuspenderlo, se descongela en un baño de agua a 50 °C durante 5 min y se agita vigorosamente con un *vortex*. Se puede controlar la integridad del RNA extraído corriéndolo en un gel de agarosa 1% p/v, a un voltaje alto y por poco tiempo, para disminuir la degradación durante la corrida. En una preparación buena de RNA, deben observarse 3 bandas correspondientes, de mayor a menor tamaño, al rRNA 28S, al rRNA 18S y a los tRNA.

## RT-PCR

Con el objetivo de evaluar el *splicing* del mRNA transcripto, se realiza una RT-PCR, es decir, una reacción de transcripción reversa (RT) para producir cDNA a partir del RNA, que servirá a su vez como molde de una reacción posterior de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la cual se amplificará el fragmento de interés utilizando *primers* específicos. La cuantificación del RNA se llevó a cabo utilizando el Qubit fluorometer (Invitrogen). Este sistema mide fluorescencia asociada al RNA al agregar un compuesto específico que sólo se asocia con el RNA y sólo fluoresce unido a él. Para cuantificar el RNA extraído de Hep3B se realizó una dilución 1/50 y se utilizaron 10 µl en un volumen final de 200 µl conteniendo buffer y el compuesto fluorescente.

### Transcripción reversa (RT)

La RT puede realizarse utilizando un *primer* que permitirá la posterior amplificación por PCR de cualquier mensajero poliadenilado (*primer* oligo dT) o un primer específico para la posterior PCR de EDI (pSVcDNA). Ambas reacciones son esencialmente iguales, excepto que si se utiliza oligo dT como *primer* se usa 10 veces más que del *primer* específico según lo indicado por el fabricante (Invitrogen).

Primer para RT específica de EDI

pSVcDNA: 5'-GGTATTTGGAGGTCAGCA-3'

- Se desnaturaliza 5 µl de RNA colocándolo 5 min a 65 °C.
- Se pasa el tubo inmediatamente a hielo para impedir la renaturalización.
- Se agrega 15 µl de *mix* a cada tubo. La *mix* está compuesta de la siguiente manera:
  - 4 µl de buffer de RT 5X.
  - 0,2 µl de DTT 100 mM.
  - 0,24 µl de dNTPs 25 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP).
  - 0,5 µl de inhibidor de RNasas 40 U/µl.
  - 0,5 µl de oligo dT 100 µM (oligo de 12-18 nucleótidos), o *primer* específico.
  - 1,5 µl de enzima M-MLV RT 200 U/µl.
- H<sub>2</sub>O c.s.p. 15 µl.
- Se deja 10 min a temperatura ambiente para que el oligo dT pueda aparearse a las colas de poliA de mRNAs poliadenilados.
- Se incuba 1h a 35 °C para que ocurra la reacción.



- Se detiene la reacción incubando 5 min a 95 °C.

### PCR de cDNA de minigén EDI de fibronectina humana

Primers para EDI

pSV5'j: 5.-CACTGCCTGCTGGTGA-3.

pSV3'j: 5.-GCGGCCAGGGGTCACGAT-3.

Reacción de PCR radiactiva

- Se utilizan 2 µl de reacción de RT que contiene el cDNA que será el molde para la reacción de PCR.

- A cada tubo de cDNA se le agregan 48 µl de *mix* que estará compuesta de la siguiente manera:

5 µl de buffer de PCR sin MgCl<sub>2</sub>

3 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM

1,5µl de DMSO (dimetil sulfóxido)

2,5 µl de *primer* pSV5'j 20 µM

2,5 µl de *primer* pSV3'j 20 µM

1 µl de dNTPs 10 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP)

0,3 µl de Taq polimerasa 5 U/µl

0,1 µl de dCTP radiactivo (10 µCi/µl, act. esp.: 3000 Ci/mmol )

H<sub>2</sub>O c.s.p. 48 µl

- Se agrega una gota de aceite mineral a cada tubo.

- Reacción de PCR:

45" a 94 °C

1' a 63 °C 30 ciclos

30" a 72 °C

La RT-PCR para amplificar Bcl-x es esencialmente igual a de EDI con las siguientes modificaciones:

Primers: Bcl-xFw, 5'AGCTGGAGTCAGTTTAGTGATGTG3', Bcl-x Rev, 5'TGAAGAGTGAGCCCAGCAGAAC3'

Condiciones de PCR: anillado 45" a 58°C, extensión 1' at 72 °C, 1 mM MgCl<sub>2</sub>,

La RT-PCR para amplificar C9 esencialmente igual a de EDI con las siguientes modificaciones:

Primers: C9 Fw 5'GCTCTTCCTTTGTTTCATCTCC3', C9 Rev 5'CATCTGGCTCGGGGTTACTGC3'.

Condiciones de PCR: anillado 15" a 60°C, extensión 1' at 72 °C, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>,

**Observación y cuantificación de productos de PCR radiactiva**

Al finalizar la reacción de PCR radiactivas, se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida 6/nativo y vertical. Luego de la corrida (1h 30' para FN, Bcl-x o C9), se seca el gel sobre un papel Whatman y se lo expone a una película con orientadores para generar una autoradiografía. Para cuantificar estos productos, se orienta la película sobre el gel utilizando los orientadores, se recortan las bandas correspondientes a los productos de interés y se cuenta la radiactividad que poseen utilizando un contador beta. Debido a que utilizamos el isótopo  $^{32}\text{P}$ , que es un emisor beta de alta energía, podemos evitar el uso de líquido de centelleo para amplificar la señal, y contamos la radiactividad con el método Cerenkov, que es en seco. La eficiencia de este método en seco es algo menor que utilizando un líquido de centelleo pero, por otra parte, es más rápido y se evita el manipuleo de tolueno.

**Obtención de mRNA con cola de PoliA**

Las fracciones de mRNA poliadeniladas (PoliA+) fueron obtenidas por medio de hibridación a oligo-dT biotinilado y posterior separación con partículas magnéticas unidas a streptavidina utilizando el sistema *PolyAtract® mRNA Isolation System* (Promega Corporation) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se colectaron las fracciones de mRNA unido a la columna (poliA+) o no (poliA-). Las cuantificaciones del mRNA presente en estas fracciones se realizaron por PCR en tiempo real.

**PCR en tiempo real:**

La cuantificación del mRNA producido por las construcciones con su señal de poliadenilación salvaje o delecionada se realizó por PCR en tiempo real. El mRNA obtenido en estas fracciones se utilizó como sustrato en una reacción de retro-transcripción utilizando el primer específico pSVcDNA. Este cDNA se utilizó a su vez como molde para la PCR en tiempo real. Primers, hFN Fw: AGCTATTCCTGCACCAACTG. hFN Rev: GCGGCCAGGGGTCACGAT. Condiciones: anillado 30'' 63°C, extensión 30'' 72°C,  $\text{MgCl}_2$  3mM, SYBR Green 1:30000 (Molecular Probes Inc). El RNA total, utilizado para relativizar los datos obtenidos por PCR en tiempo real del mRNA de FN, fue cuantificado usando un Qubit fluorometer (Invitrogen).

### Transcripción, *capping* y poliadenilación *in vitro*

Para generar un plásmido con promotor de T7 y EDI rio abajo (pT7-KS-EDA), el fragmento de restricción de 3738 pb obtenido por digestión de pSVEDA Tot con las enzimas BssHII/Bgl I fue tratado con Klenow para obtener extremos romos. Este fragmento fue sub-clonado en el sitio SmaI de pBlueScript KS+. pT7-KS-EDA fue linealizado con EcoRI. La transcripción *in vitro* se realizó con el kit *Riboprobe System-T7* (Promega) con el agregado de ribo m<sup>7</sup>G *Cap Analog* (Promega) en 5 veces de exceso relativo al GTP. La reacción fue incubada 2 horas a 37°C y luego tratada con *RQ1 DNase* (Promega) por 15 minutos. La poliA polimerasa de *E. Coli* (*Poly (A) polymerase* (Ambion)) fue utilizada para poliadenilar el RNA sintetizado *in vitro*, incubando 1 hora a 37°C según indicaciones del fabricante. El RNA fue desalado usando una columna *S-200 MicroSpin column* (GE Healthcare) y cuantificado. La transfección fue realizada bajo condiciones estándar utilizando 300 ng de RNA. Veinte horas más tarde las células fueron cosechadas y el RNA purificado. La reacción de retro-transcripción se realizó utilizando el primer pSVcDNA. Para la reacción de PCR se utilizó un *primer* 5' específico que reconoce la juntura exón-exón rio arriba de del exón EDI para evitar la amplificación lineal del pre-mRNA. Fw: 5'GACCCGGTCAACTTCAAGCTCC3', Rev: 5'GCGGCCAGGGGTACGAT3'. Condiciones: anillado 15'' 55°C, extensión 30'' 72°C, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM.

### Determinación del nivel de apoptosis

Para la determinación del grado de apoptosis se utilizaron 2 técnicas distintas. Se midió la presencia del fosfolípido fosfatidil-serina en la membrana extrema por unión de anexina-V-FITC (la cuál es impermeable a la membrana plasmática) o la activación de la caspasa efectora 3.

Anexina V: La apoptosis y la necrosis secundaria a la apoptosis se analizó por ioduro de propidio y anexina-V utilizando el sistema *Annexin-V apoptosis detection kit* (BD Biosciences, San José, CA) según indicación del fabricante. Una vez incubadas con ioduro de propidio y anexina-V-FITC las células fueron analizadas por citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences, San José, CA) midiendo, al menos, 15.000 células por condición.

Caspasa 3: La medición de la actividad de caspasa 3 fue realizada por un método colorimétrico *caspase 3 colorimetric protease assay* (Invitrogen, número de catálogo KHZ0022). Brevemente: las células se resuspenden en buffer de lisis suave, se centrifugan y se determina la cantidad de proteínas en el sobrenadante por el método de Bradford (Biorad). Luego de igualar la concentración de los distintos extractos, ente 50 y 200 µg de proteína se incuban 2 hs a 37°C con un sustrato

colorimétrico de caspasa 3 (un tetrapéptido reconocido por la caspasa 3 unido a un grupo paranitroanilina, la cual sólo produce color amarillo una vez liberada del tetrapeptido) y se mide absorbancia a 415 nm.

#### **Determinación de la tasa de elongación de la pol II por FRAP**

Se utilizaron las células U2OS-clone16 pExo-IRES-TK, se las transfectó con vectores de expresión de MS2-GFP y el análisis de fluorescencia de los sitios de transcripción en un microscopio de campo ancho se realizó como en (Boireau, Maiuri et al. 2007). Brevemente, se utilizó un Nikon TE200 equipado con imagen confocal y de campo ancho (100X, NA 1.45). Los sitios de transcripción fueron fotoblanqueados con el puerto confocal usando una región circular de 2,5 micrones de diámetro (bleaching time: 1s) Las imágenes fueron grabadas con una cámara EM-CCD camera (Cascade 512B, Roper) y una piezo-motor en el objetivo para capturar el eje Z cada 3 a 12 segundos. Para el análisis de la imagen, las intensidades de fluorescencia fueron medidas en un paralelepípedo (1X1X1.5 micrones) colocado en el área más intensa del sitio de transcripción. Esto posibilita el seguimiento del sitio de transcripción en 3D y la corrección debida al movimiento celular. Las intensidades de fluorescencia fueron normalizadas y los valores posteriores al fotoblanqueado fueron adicionalmente fijados en cero.

#### **Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)**

Los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina fueron realizados en el laboratorio del Doctor Bentley como ha sido descrito en (Glover-Cutter, Kim et al. 2008).

#### **Western Blot**

Las células fueron directamente tratadas en buffer Laemmli 2X, resuspendidas y calentadas 5' a 95°C. Se utilizó el sistema vertical de Bio-Rad. Para los *westerns* de pol II se utilizó un gel de poliacrilamida-bisacrilamida 6% y para los westerns de ERK-2 el gel separador se preparó 12% según se indica en el manual *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* ([www.molecularcloning.com](http://www.molecularcloning.com)). Las muestras se sometieron a electroforesis vertical por 3 hs (pol II) o 1,5 hs (ERK-2). Una vez concluida

la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) por transferencia húmeda en buffer tris-glicina1X, SDS 0,01% , metanol 20% por 2,5 hs (pol II) o 1 h (ERK-2) a voltaje constante (100V). Una vez finalizado este tiempo, la membrana se bloqueo en leche 5% en TBS tween 0,05% (TTBS) por 1h, se la incubó con el anticuerpo primario según se indica más abajo y se lavó con TTBS 3 a 5 veces por 5'. Finalizado este tiempo se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a HRP correspondiente diluido 1/5000 en leche 5% /TTBS, se lavó igual que antes para remover el anticuerpo pegado inespecíficamente y se reveló utilizando el sistema ECL-PLUS (Amersham) según indicación del fabricante, exponiéndose la membrana a una placa radiográfica (Kodak).

Anticuerpos: H5 (covance) 1/500 diluido en BSA 3% preparada en TTBS; H14 (covance) 1/500 en BSA 3% ; N20 (santa cruz) 1/250 en BSA 3% ; ERK-2 1/2500 en BSA 3% .

### Experimentos de *microarrays* y validaciones por PCR en tiempo real

Los experimentos de *microarray* sobre células Hep3B fueron realizados en el laboratorio del doctor Juan Valcárcel en Barcelona, España. Brevemente: células Hep3B fueron irradiadas con luz UV (40J/m<sup>2</sup>) y 6 horas después fueron cosechadas. El RNA fue purificado utilizando el sistema *RNeasy Mini kit* (Qiagen) y tratado con *DNase RNase free* (Qiagen). El cDNA y el cRNA marcado con Cy5 y Cy3 fue generado utilizando el sistema *Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification kit*. El cRNA fue luego purificado utilizando el sistema *RNeasy Mini kit* (Qiagen). 8 µg del cRNA obtenido en cada condición fue utilizado en la hibridización de los *microarrays* (*Agilent In situ hybridization kit plus*). Luego de la hibridización, los *microarrays* fueron lavados y *scaneados*. Tres replicas biológicas fueron hibridadas y a su vez los colorantes fueron luego intercambiados para evitar falsos resultados asociados al proceso de marcación. Los valores de expresión representan el promedio de las señales de todas las sondas de un gen. El análisis estadístico se realizó gracias al sistema *Linear Models for Microarray Data* (*Limma; Bioconductor Project; Dudoit, et al., 2003*). La corrección del ruido del experimento o *background* se realizó usando el programa *Normexp* (*Ritchie, et al., 2007*). El análisis de regresión lineal (*Locally weighted linear regression analysis, LOWESS*) fue utilizado como método de normalización (Yang, et al., 2002). Para validar los cambios en los patrones de AS predichos por el *microarray*, se realizaron reacciones de PCR en tiempo real utilizando *primers* que reconocen tanto las juntas exón-exón así como exones constitutivos (ver Anexo). El cDNA fue sintetizado utilizando *primers random hexamers* y 1µg de RNA total utilizando Superscript II (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante. La PCR en tiempo real (45 ciclos) se realizó utilizando el sistema

*Lightcycler DNA Master SYBRgreen I* (Roche) en placas de 384 en un Lightcycler 480 (Roche). Este estudio se realizó para 10 genes diferentes y el 80% de los eventos de AS fueron validados, en concordancia con resultados previos utilizando esta misma plataforma de *microarray* (Ben-Dov C., resultados no publicados). El análisis de la función de cada gen (*Gene Ontology analyses*) fue realizado utilizando el sistema *Ingenuity Pathways Analysis* (Ingenuity® Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) Ritchie, ME, Silver, J, Oshlack, A, Holmes, M, Diyagama, D, Holloway, A, and Smyth, GK (2007). A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics* 23, 2700-2707. Yang, S. Dudoit, P. Luu and T. P. Speed. Normalization for cDNA Microarray Data. SPIE BIOS 2001, San Jose, California, January 2001.

## Anexo. Microarray

### Splicing alternativo y expresión en respuesta a UV 40J/m<sup>2</sup>.

Lista de genes con cambios en algún ASE y sin cambios en sus niveles de mRNA acumulado (sólo se listarán genes o ASEs que hayan mostrado cambios en respuesta a UV)

		GE		Reference RefSeq	Name	Symbol
gene name	GeneID	GE average	GE median			
ARMET	G00012	-0.1806	-0.1864	NM_006010	Arginine-rich, mutated in early stage tumors	ARMET
AURKB	G00016	-0.1194	-0.11	NM_004217	Aurora kinase B	AURKB
CAD	G00039	0.0594	0.0893	NM_004341	Carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihy	CAD
CASP3	G00044	-0.375	-0.3622	NM_004346	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP3
CHEK2	G00073	-0.3768	-0.3392	NM_001005735	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	CHEK2
DIABLO	G00092	-0.1756	-0.1953	NM_019887	Diablo homolog (Drosophila)	DIABLO
E2F4	G00096	-0.1129	-0.0807	NM_001950	E2F transcription factor 4, p107/p130-binding	E2F4
FOS	G00111	0.1922	0.178	NM_005252	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS
HDAC3	G00118	0.1645	0.1513	NM_003883	Histone deacetylase 3	HDAC3
MKNK1	G00171	0.1073	0.1025	NM_003684	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1	MKNK1
MKNK2	G00172	-0.319	-0.2475	NM_017572	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2	MKNK2
MLLT10	G00174	0.2392	0.233	NM_001009569	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)	MLLT10
PMS1	G00217	-0.0784	-0.0883	NM_000534	PMS1 postmeiotic segregation increased 1 (S. cerevisiae)	PMS1
RB1CC1	G00231	-0.2538	-0.3368	NM_014781	RB1-inducible coiled-coil 1	RB1CC1
RELA	G00234	0.2024	0.1895	NM_021975	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A, nuclear factor of kappa	RELA
SPTAN1	G00246	0.199	0.1478	NM_003127	Spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)	SPTAN1
TCL1A	G00253	0.0707	0.0871	NM_021966	T-cell leukemia/lymphoma 1A	TCL1A
TNFRSF1B	G00265	0.0503	0.0411	NM_001066	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	TNFRSF1B
ZNF198	G00279	-0.3277	-0.3422	NM_003453	Zinc finger, MYM-type 2	ZMYM2
MSH6	G00288	-0.2825	-0.2929	NM_000179	MutS homolog 6 (E. coli)	MSH6
MLH1	G00289	-0.2377	-0.1477	NM_000249	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)	MLH1
ATR	G00310	-0.0877	-0.1393	NM_001184	Ataxia telangiectasia and Rad3 related	ATR
ATF2	G00326	-0.1078	-0.1001	NM_001880	Activating transcription factor 2	ATF2
MYH9	G00336	-0.0429	-0.0369	NM_002473	Myosin, heavy chain 9, non-muscle	MYH9
MAP3K7IP1	G00421	0.2614	0.2434	NM_006116	Mitogen-activated protein kinase kinase 7 interacting protein 1	MAP3K7IP1
MALT1	G00430	-0.2854	-0.3145	NM_006785	Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1	MALT1
PRKDC	G00433	0.0337	-0.0251	NM_006904	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	PRKDC
ATM	G00460	-0.1333	-0.1506	NM_138292	Ataxia telangiectasia mutated	ATM
CCNT2	7	0.0029	0.0065	NM_001241	Cydn T2	CCNT2
EWS	1009	-0.0696	-0.0651	NM_005243	Ewing sarcoma breakpoint region 1	EWSR1
RAYR1	1010	0.3399	0.3377	NM_133452	Ribonucleoprotein, PTB-binding 1	RAYR1
NOVA1	28	0.2114	0.2093	NM_002515	Neuro-oncological ventral antigen 1	NOVA1
PABP1	30	0.2929	0.3225	NM_002568	Poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	PABPC1
RENT1	36	0.307	0.2969	NM_002911	UPF1 regulator of nonsense transcripts homolog (yeast)	UPF1
SFRS2	38	-0.16	-0.1749	NM_003016	Splicing factor, arginine/serine-rich 2	SFRS2
PABP_4 / PABPC4	62	-0.1185	0.0647	NM_003819	Poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 (inducible form)	PABPC4
CLK2	70	0.0167	-0.1737	NM_003993	CDC-like kinase 2	CLK2
tra2_beta / SFRS10	79	-0.3083	-0.3408	NM_004593	Splicing factor, arginine/serine-rich 10 (transformer 2 homolog, Drosophila)	SFRS10
.5_trf-snRNP / NHP2L	96	-0.2047	-0.159	NM_005008	NHP2 non-histone chromosome protein 2-like 1 (S. cerevisiae)	NHP2L1
SRp55 / SFRS6	122	0.1752	0.1663	NM_006275	Splicing factor, arginine/serine-rich 6	SFRS6
NOL5A	127	-0.2894	-0.2984	NM_006392	Nucleolar protein 5A (56kDa with KKE/D repeat)	NOL5A
CUGBP	132	-0.1428	-0.2391	NM_006560	CUG triplet repeat, RNA binding protein 1	CUGBP1
SAD1	134	0.2554	0.2652	NM_006590	Ubiquitin specific peptidase 39	USP39
tra2_alpha	167	-0.2631	-0.2673	NM_013293	Transformer-2 alpha	TRA2A
ACINUS	180	0.2841	0.2976	NM_014977	Apoptotic chromatin condensation inducer 1	ACIN1
hnRNP_RALY	195	0.0519	0.0836	NM_016732	RNA binding protein, autoantigenic (hnRNP-associated with lethal yellow ho	RALY
PSIP1	240	0.3021	0.2554	NM_033222	PC4 and SFRS1 interacting protein 1	PSIP1
RNPS1	242	-0.1748	-0.1588	NM_080594	RNA binding protein S1, serine-rich domain	RNPS1
SFRS12	246	-0.3482	-0.3384	NM_139168	Splicing factor, arginine/serine-rich 12	SFRS12
Hcc1 (RNPC2)	258	0.202	0.2013	NM_004902	RNA binding motif protein 39	RBM39
SmB/B' / SNRPB	259	-0.3488	-0.3661	NM_198216	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1	SNRPB
QKI	263	-0.0476	0.0544	NM_206853	Quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse)	QKI
DDX23	185_I	0.124	0.1171	NM_004818	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 23	DDX23
DEK	193_I	0.3432	0.3475	NM_003472	DEK oncogene (DNA binding)	DEK
DXH9	202_I	0.0556	0.0314	NM_001357	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9	DXH9
MBNL1	419_I	-0.2867	-0.2905	NM_021038	Muscleblind-like (Drosophila)	MBNL1
MBNL2	420_I	-0.2977	-0.2387	NM_144778	Muscleblind-like 2 (Drosophila)	MBNL2
RBM10	628_I	0.3152	0.3002	NM_152856	RNA binding motif protein 10	RBM10
C1QBP	73_I	-0.2906	-0.2964	NM_001212	Complement component 1, q subcomponent binding protein	C1QBP

## Lista de genes con cambios en algún ASE y también en sus niveles de mRNA acumulado

gene name	GeneID	GE		Reference RefSeq	Name	Symbol
		GE average	GE median			
AP5GL	G00008	-0.8591	-0.7789	NM_004849	ATG5 autophagy related 5 homolog (S. cerevisiae)	ATG5
STK6	G00015	-0.7749	-0.7947	NM_003600	Aurora kinase A	AURKA
CCNE1	G00052	-0.4455	-0.5291	NM_001238	Cyclin E1	CCNE1
CDC2	G00061	-1.7115	-1.6656	NM_001786	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	CDC2
CHEK1	G00072	-0.5171	-0.4555	NM_001274	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	CHEK1
NFKBIA	G00188	-0.8495	-0.8447	NM_020529	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor	NFKBIA
PDCD10	G00203	-1.384	-1.312	NM_007217	Programmed cell death 10	PDCD10
SOS1	G00245	-0.7352	-0.678	NM_005633	Son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	SOS1
VEGF	G00278	0.6673	0.6383	NM_003376	Vascular endothelial growth factor A	VEGFA
ITGB1	G00331	-0.6572	-0.6907	NM_002211	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includ	ITGB1
MAP4K3	G00368	-0.5783	-0.6406	NM_003618	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3	MAP4K3
CCNC	G00398	-0.9882	-1.007	NM_005190	Cyclin C	CCNC
PLK2	G00427	-0.8766	-0.7501	NM_006622	Polo-like kinase 2 (Drosophila)	PLK2
PRP43 / DDX15	10	-1.2025	-1.1904	NM_001358	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15	DXH15
SRP20 / SFRS3	39	-0.8877	-0.901	NM_003017	Splicing factor, arginine/serine-rich 3	SFRS3
SSRP1	48	0.566	0.5909	NM_003146	Structure specific recognition protein 1	SSRP1
ZNF207	50	-0.5744	-0.6541	NM_003457	Zinc finger protein 207	ZNF207
DUSP11	53	-0.6403	-0.6402	NM_003584	Dual specificity phosphatase 11 (RNA/RNP complex 1-interacting)	DUSP11
SIP1	54	-0.9738	-0.8365	NM_003616	Survival of motor neuron protein interacting protein 1	SIP1
KSRP / KHSRP	57	0.5959	0.589	NM_003685	KH-type splicing regulatory protein (FUSE binding protein 2)	KHSRP
CLK1	71	-1.3932	-1.3822	NM_004071	CDC-like kinase 1	CLK1
p68 / DDX5	74	-0.7354	-0.7309	NM_004396	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	DDX5
SF1	82	0.7333	0.6887	NM_004630	Splicing factor 1	SF1
SRP54(SFRS11)	88	-0.5307	-0.5385	NM_004768	Splicing factor, arginine/serine-rich 11	SFRS11
9G8 / SFRS7	123	-0.6017	-0.617	NM_006276	Splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa	SFRS7
LSM1	174	-0.6156	-0.6123	NM_014462	LSM1 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	LSM1
PRP5	178	-0.7089	-0.7024	NM_014829	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46	DDX46
RBP_7 / RBM7	188	-1.2164	-1.1393	NM_016090	RNA binding motif protein 7	RBM7
FN1	274	0.6005	0.6127	NM_212482	Fibronectin 1	FN1
LSM8	410	-0.5706	-0.5554	NM_016200	LSM8 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	LSM8
RBM15	632	-1.2544	-1.1514	NM_022768	RNA binding motif protein 15	RBM15
RBMS1	648	-0.6018	-0.538	NM_002897	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	RBMS1
MAP2K4	G00144	-0.4675	-0.4271	AK131544	Mitogen-activated protein kinase kinase 4	MAP2K4
MAP4K5	G00151	-0.4252	-0.4168	NM_198794	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5	MAP4K5
CASP6	G00046	-0.4591	-0.4565	NM_001226	Caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase	CASP6
PTPN12	G00356	-0.3539	-0.3882	BC050008	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	PTPN12
BUB3	87	-0.4043	-0.4097	AK226060	BUB3 budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog (yeast)	BUB3
SmD1 / SNRNP1	146	-0.382	-0.3783	CR613811	Small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide 16kDa	SNRNP1
SPF31 / DNAJC8	172	-0.4144	-0.4007	CD013879	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 8	DNAJC8
CROP	165	-0.4134	-0.4041	NM_016424	Cisplatin resistance-associated overexpressed protein	CROP
ASCC3L1	37	0.4688	0.4873	NM_014014	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1	ASCC3L1
THOC1	784	-0.4348	-0.3826	NM_005131	THO complex 1	THOC1
TIAL1	789	-0.4206	-0.4383	NM_001033925	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1	TIAL1



## ASE de genes sin cambios en sus niveles de mRNA acumulado

EventID	gene name	event	GeneID	Reference RefSeq	Symbol
00012.0010.1	ARMET	novel_exons	G00012	NM_006010	ARMET
00016.0033.1	AURKB	novel_exons	G00016	NM_004217	AURKB
00039.0024.1	CAD	novel_exons	G00039	NM_004341	CAD
00044.0011.2	CASP3	alt_splice_donor	G00044	NM_004346	CASP3
00073.0041.1	CHEK2	exon(s)skipped	G00073	NM_001005735	CHEK2
00073.0106.1	CHEK2	novel_exons	G00073	NM_001005735	CHEK2
00092.0024.1	DIABLO	alt_splice_donor	G00092	NM_019887	DIABLO
00096.0007.1	E2F4	alt_splice_donor	G00096	NM_001950	E2F4
00096.0009.1	E2F4	exon(s)skipped	G00096	NM_001950	E2F4
00111.0008.1	FOS	alt_splice_donor	G00111	NM_005252	FOS
00111.0016.1	FOS	exon(s)skipped	G00111	NM_005252	FOS
00118.0016.1	HDAC3	exon(s)skipped	G00118	NM_003883	HDAC3
00171.0009.1	MKNK1	exon(s)skipped	G00171	NM_003684	MKNK1
00172.0014.1	MKNK2	alt_splice_acceptor	G00172	NM_017572	MKNK2
00172.0029.2	MKNK2	alt_splice_donor	G00172	NM_017572	MKNK2
00174.0001.2	MLLT10	novel_exons	G00174	NM_001009569	MLLT10
00217.0014.1	PMS1	novel_exons	G00217	NM_000534	PMS1
00231.0003.1	RB1CC1	alt_splice_acceptor	G00231	NM_014781	RB1CC1
00234.0002.1	RELA	alt_splice_acceptor	G00234	NM_021975	RELA
00234.0011.1	RELA	exon(s)skipped	G00234	NM_021975	RELA
00246.0015.1	SPTAN1	novel_exons	G00246	NM_003127	SPTAN1
00253.0005.1	TCL1A	alt_splice_acceptor	G00253	NM_021966	TCL1A
00253.0009.1	TCL1A	exon(s)skipped	G00253	NM_021966	TCL1A
00265.0006.1	TNFRSF1B	alt_splice_acceptor	G00265	NM_001066	TNFRSF1B
00279.0011.3	ZNF198	exon(s)skipped	G00279	NM_003453	ZMYM2
00288.0005.1	MSH6	exon(s)skipped	G00288	NM_000179	MSH6
00289.0009.1	MLH1	alt_splice_acceptor	G00289	NM_000249	MLH1
00289.0024.1	MLH1	exon(s)skipped	G00289	NM_000249	MLH1
00310.0008.7	ATR	alt_splice_acceptor	G00310	NM_001184	ATR
00326.0004.2	ATF2	novel_exons	G00326	NM_001890	ATF2
00326.0011.1	ATF2	exon(s)skipped	G00326	NM_001880	ATF2
00336.0009.4	MYH9	alt_splice_acceptor	G00336	NM_002473	MYH9
00421.0012.1	MAP3K7IP1	novel_exons	G00421	NM_006116	MAP3K7IP1
00430.0014.1	MALT1	alt_splice_donor	G00430	NM_006785	MALT1
00433.0004.2	PRKDC	exon(s)skipped	G00433	NM_006904	PRKDC
00433.0004.3	PRKDC	alt_splice_donor	G00433	NM_006904	PRKDC
00433.0004.4	PRKDC	exon(s)skipped	G00433	NM_006904	PRKDC
00460.0007.1	ATM	exon(s)skipped	G00460	NM_0138292	ATM
7.4.1	CCNT2	novel_exons	7	NM_001241	CCNT2
09.4.1	EWS	novel_exons	1009	NM_005243	EWSR1
010.3.1	RAVER1	exon(s)skipped	1010	NM_0133452	RAVER1
28.2.1	NOVA1	exon(s)skipped	28	NM_002515	NOVA1
28.2.3	NOVA1	alt_splice_acceptor	28	NM_002515	NOVA1
30.3.1	PABP1	exon(s)skipped	30	NM_002568	PABPC1
36.2.1	RENT1	alt_splice_acceptor	36	NM_002911	UPF1
38.1.3	SFRS2	alt_splice_donor	38	NM_003016	SFRS2
38.1.4	SFRS2	alt_splice_acceptor	38	NM_003016	SFRS2
38.2.1	SFRS2	intron_retained	38	NM_003016	SFRS2
38.3.3	SFRS2	alt_splice_donor	38	NM_003016	SFRS2

38.3.4	SFRS2	alt_splice_acceptor	38	NM_003016	SFRS2
38.6.1	SFRS2	novel_exons	38	NM_003016	SFRS2
62.3.1	PABP_4 / PABPC4	alt_splice_donor	62	NM_003819	PABPC4
70.9.1	CLK2	novel_exons	70	NM_003993	CLK2
79.3.1	tra2_beta / SFRS10	novel_exons	79	NM_004593	SFRS10
79.6.1	tra2_beta / SFRS10	novel_exons	79	NM_004593	SFRS10
79.7.1	tra2_beta / SFRS10	novel_exons	79	NM_004593	SFRS10
96.4.1	15.5_tri-snRNP / NHP2L1	novel_exons	96	NM_005008	NHP2L1
122.5.1	SRp55 / SFRS6	novel_exons	122	NM_006275	SFRS6
127.3.1	NOL5A	novel_exons	127	NM_006392	NOL5A
127.5.2	NOL5A	novel_exons	127	NM_006392	NOL5A
132.5.1	CUG-BP	novel_exons	132	NM_006560	CUGBP1
132.5.2	CUG-BP	novel_exons	132	NM_006560	CUGBP1
132.6.1	CUG-BP	novel_exons	132	NM_006560	CUGBP1
134.7.1	SAD1	exon(s)skipped	134	NM_006590	USP39
167.4.1	tra2_alpha	novel_exons	167	NM_013293	TRA2A
167.7.1	tra2_alpha	novel_exons	167	NM_013293	TRA2A
180.5.1	ACINUS	novel_exons	180	NM_014977	ACIN1
195.1.1	hnRNP_RALY	novel_exons	195	NM_016732	RALY
195.3.1	hnRNP_RALY	exon(s)skipped	195	NM_016732	RALY
195.5.1	hnRNP_RALY	novel_exons	195	NM_016732	RALY
240.3.2	PSIP1	novel_exons	240	NM_033222	PSIP1
242.9.2	RNPS1	alt_splice_donor	242	NM_080594	RNPS1
246.3.2	SFRS12	exon(s)skipped	246	NM_139168	SFRS12
246.6.2	SFRS12	exon(s)skipped	246	NM_139168	SFRS12
258.1.1	Hcc1_(RNPC2)	exon(s)skipped	258	NM_004902	RBM39
258.2.1	Hcc1_(RNPC2)	novel_exons	258	NM_004902	RBM39
259.5.1	SmB/B' / SNRPB	alt_splice_acceptor	259	NM_198216	SNRPB
263.1.1	QKI	alt_splice_acceptor	263	NM_206853	QKI
263.1.2	QKI	alt_splice_donor	263	NM_206853	QKI
185:1_13:23	DDX23	novel_exons	185_I	NM_004818	DDX23
193:3_1:8	DEK	exon(s)skipped	193_I	NM_003472	DEK
202:1_6:32	DHX9	novel_exons	202_I	NM_001357	DHX9
419:1_17:107	MBNL1	Mutually-Exclusive-Exons	419_I	NM_021038	MBNL1
420:6_1:14	MBNL2	exon(s)skipped	420_I	NM_144778	MBNL2
420:8_1:18	MBNL2	exon(s)skipped	420_I	NM_144778	MBNL2
628:1_6:13	RBM10	novel_exons	628_I	NM_152856	RBM10
73:1_10:3	C1QBP	novel_exons	73_I	NM_001212	C1QBP

## ASE de genes con cambios en sus niveles de mRNA acumulado

EventID	gene name	event	GeneID	Reference RefSeq	Symbol
00008.0001.1	AP5GL	alt_splice_acceptor	G00008	NM_004849	ATG5
00008.0003.1	AP5GL	exon(s)skipped	G00008	NM_004849	ATG5
00008.0005.1	AP5GL	exon(s)skipped	G00008	NM_004849	ATG5
00015.0001.1	STK6	novel_exons	G00015	NM_003600	AURKA
00015.0005.1	STK6	alt_splice_donor	G00015	NM_003600	AURKA
00015.0006.1	STK6	alt_splice_donor	G00015	NM_003600	AURKA
00015.0008.1	STK6	alt_splice_donor	G00015	NM_003600	AURKA
00015.0024.2	STK6	exon(s)skipped	G00015	NM_003600	AURKA
00015.0101.1	STK6	novel_exons	G00015	NM_003600	AURKA
00052.0010.1	CCNE1	exon(s)skipped	G00052	NM_001238	CCNE1
00052.0013.1	CCNE1	exon(s)skipped	G00052	NM_001238	CCNE1
00061.0005.1	CDC2	alt_splice_donor	G00061	NM_001786	CDC2
00072.0016.1	CHEK1	alt_splice_donor	G00072	NM_001274	CHEK1
00072.0029.1	CHEK1	exon(s)skipped	G00072	NM_001274	CHEK1
00072.0030.1	CHEK1	alt_splice_donor	G00072	NM_001274	CHEK1
00188.0011.1	NFKBIA	alt_splice_acceptor	G00188	NM_020529	NFKBIA
00188.0060.1	NFKBIA	exon(s)skipped	G00188	NM_020529	NFKBIA
00188.0097.1	NFKBIA	exon(s)skipped	G00188	NM_020529	NFKBIA
00203.0009.2	PDCD10	alt_splice_donor	G00203	NM_007217	PDCD10
00203.0044.1	PDCD10	exon(s)skipped	G00203	NM_007217	PDCD10
00203.0076.2	PDCD10	alt_splice_acceptor	G00203	NM_007217	PDCD10
00203.0114.1	PDCD10	exon(s)skipped	G00203	NM_007217	PDCD10
00245.0001.1	SOS1	exon(s)skipped	G00245	NM_005633	SOS1
00245.0001.2	SOS1	exon(s)skipped	G00245	NM_005633	SOS1
00245.0001.3	SOS1	novel_exons	G00245	NM_005633	SOS1
00245.0001.4	SOS1	exon(s)skipped	G00245	NM_005633	SOS1
00245.0001.5	SOS1	alt_splice_acceptor	G00245	NM_005633	SOS1
00245.0001.6	SOS1	exon(s)skipped	G00245	NM_005633	SOS1
00245.0001.7	SOS1	exon(s)skipped	G00245	NM_005633	SOS1
00278.0003.1	VEGF	alt_splice_donor	G00278	NM_003376	VEGFA
00278.0006.1	VEGF	exon(s)skipped	G00278	NM_003376	VEGFA
00331.0001.1	ITGB1	exon(s)skipped	G00331	NM_002211	ITGB1
00331.0008.1	ITGB1	exon(s)skipped	G00331	NM_002211	ITGB1
00331.0040.1	ITGB1	exon(s)skipped	G00331	NM_002211	ITGB1
00331.0040.2	ITGB1	alt_splice_donor	G00331	NM_002211	ITGB1
00331.0042.1	ITGB1	exon(s)skipped	G00331	NM_002211	ITGB1
00331.0057.1	ITGB1	novel_exons	G00331	NM_002211	ITGB1
00368.0001.1	MAP4K3	exon(s)skipped	G00368	NM_003618	MAP4K3
00368.0003.3	MAP4K3	exon(s)skipped	G00368	NM_003618	MAP4K3
00368.0003.4	MAP4K3	exon(s)skipped	G00368	NM_003618	MAP4K3
00368.0003.5	MAP4K3	exon(s)skipped	G00368	NM_003618	MAP4K3
00368.0007.1	MAP4K3	exon(s)skipped	G00368	NM_003618	MAP4K3
00398.0011.1	CCNC	novel_exons	G00398	NM_005190	CCNC
00398.0034.1	CCNC	novel_exons	G00398	NM_005190	CCNC
00398.0035.1	CCNC	alt_splice_donor	G00398	NM_005190	CCNC
00398.0067.1	CCNC	novel_exons	G00398	NM_005190	CCNC
00427.0001.1	PLK2	exon(s)skipped	G00427	NM_006622	PLK2
10.2.1	PRP43 / DDX15	exon(s)skipped	10	NM_001358	DHX15
39.3.1	SRp20 / SFRS3	novel_exons	39	NM_003017	SFRS3
39.4.1	SRp20 / SFRS3	novel_exons	39	NM_003017	SFRS3

39.5.1	SRp20 / SFRS3	novel_exons	39	NM_003017	SFRS3
48.1.1	SSRP1	exon(s)skipped	48	NM_003146	SSRP1
48.5.1	SSRP1	exon(s)skipped	48	NM_003146	SSRP1
50.1.2	ZNF207	alt_splice_donor	50	NM_003457	ZNF207
50.2.1	ZNF207	exon(s)skipped	50	NM_003457	ZNF207
50.2.2	ZNF207	alt_splice_donor	50	NM_003457	ZNF207
50.3.1	ZNF207	exon(s)skipped	50	NM_003457	ZNF207
50.4.1	ZNF207	exon(s)skipped	50	NM_003457	ZNF207
50.5.2	ZNF207	exon(s)skipped	50	NM_003457	ZNF207
53.1.1	DUSP11	exon(s)skipped	53	NM_003584	DUSP11
54.1.1	SIP1	exon(s)skipped	54	NM_003616	SIP1
54.4.1	SIP1	exon(s)skipped	54	NM_003616	SIP1
57.3.1	KSRP / KHSRP	novel_exons	57	NM_003685	KHSRP
57.8.1	KSRP / KHSRP	exon(s)skipped	57	NM_003685	KHSRP
71.3.1	CLK1	exon(s)skipped	71	NM_004071	CLK1
71.4.2	CLK1	intron_retained	71	NM_004071	CLK1
71.5.1	CLK1	exon(s)skipped	71	NM_004071	CLK1
71.5.2	CLK1	alt_splice_donor	71	NM_004071	CLK1
71.8.1	CLK1	exon(s)skipped	71	NM_004071	CLK1
74.2.1	p68 / DDX5	novel_exons	74	NM_004396	DDX5
82.2.1	SF1	alt_splice_donor	82	NM_004630	SF1
82.5.1	SF1	exon(s)skipped	82	NM_004630	SF1
82.7.1	SF1	exon(s)skipped	82	NM_004630	SF1
88.1.1	SRp54(SFRS11)	exon(s)skipped	88	NM_004768	SFRS11
88.2.1	SRp54(SFRS11)	novel_exons	88	NM_004768	SFRS11
123.2.1	9G8 / SFRS7	exon(s)skipped	123	NM_006276	SFRS7
123.2.2	9G8 / SFRS7	exon(s)skipped	123	NM_006276	SFRS7
123.3.1	9G8 / SFRS7	exon(s)skipped	123	NM_006276	SFRS7
123.4.1	9G8 / SFRS7	exon(s)skipped	123	NM_006276	SFRS7
123.5.1	9G8 / SFRS7	exon(s)skipped	123	NM_006276	SFRS7
123.5.2	9G8 / SFRS7	exon(s)skipped	123	NM_006276	SFRS7
174.4.1	LSM1	novel_exons	174	NM_014462	LSM1
178.2.1	PRP5	novel_exons	178	NM_014829	DDX46
188.3.1	RBP_7 / RBM7	exon(s)skipped	188	NM_016090	RBM7
274:19_1:88	FN1	exon(s)skipped	274_I	NM_212482	FN1
274:3_1:53	FN1	exon(s)skipped	274_I	NM_212482	FN1
274:5_1:62	FN1	alt_splice_acceptor	274_I	NM_212482	FN1
410:1_2:21	LSM8	novel_exons	410_I	NM_016200	LSM8
632:2_1:4	RBM15	exon(s)skipped	632_I	NM_022768	RBM15
648:1_3:6	RBMS1	novel_exons	648_I	NM_002897	RBMS1
674:16_1:7	SF1	exon(s)skipped	674_I	NM_004630	SF1
00046.0004.1	CASP6	exon(s)skipped	G00046	NM_001226	CASP6
00144.0008.1	MAP2K4	exon(s)skipped	G00144	NM_003010	MAP2K4
00144.0010.1	MAP2K4	exon(s)skipped	G00144	NM_003010	MAP2K4
00151.0005.1	MAP4K5	alt_splice_donor	G00151	NM_006575	MAP4K5
00356.0013.1	PTPN12	novel_exons	G00356	NM_002835	PTPN12
00356.0025.1	PTPN12	exon(s)skipped	G00356	NM_002835	PTPN12
87.2.1	BUB3	alt_splice_acceptor	87	NM_004725	BUB3
146.1.1	SmD1 / SNRPD1	alt_splice_acceptor	146	NM_006938	SNRPD1
172.1.1	SPF31 / DNAJC8	novel_exons	172	NM_014280	DNAJC8
165:1_18:9	CROP	novel_exons	165_I	NM_006107	CROP
165:1_5:33	CROP	Mutually-Exclusive-Exons	165_I	NM_006107	CROP
165:1_9:11	CROP	novel_exons	165_I	NM_006107	CROP

37:1_2:9	ASCC3L1	alt_splice_donor	37_I	NM_014014	ASCC3L1
784:1_11:25	THOC1	Mutually-Exclusive-Exons	784_I	NM_005131	THOC1
789:1_14:90	TIAL1	Mutually-Exclusive-Exons	789_I	NM_001033925	TIAL1
789:1_5:70	TIAL1	novel_exons	789_I	NM_001033925	TIAL1
789:1_6:76	TIAL1	novel_exons	789_I	NM_001033925	TIAL1



**Primers usados para la validación por PCR en tiempo real del microarray (10 genes)**

Gene Symbol		Reference
<b>TNFRSF10B</b>		NM_003842
event:	00263.0017.1	-
type of event:	alternative 5' splice site	
	<b>Primers</b>	<b>sequence</b>
exon2	TNFRSF10B_e2_for	CTGCTCTGATCACCCAACAA
	TNFRSF10B_e2_rev	AGGTGGACACAATCCCTCTG
exon3+11bp	TNFRSF10B_e3_rev	TGCATCTCCTGCAAATATGG
	TNFRSF10B_e3_for	TGAATCACACCTGGTGCAG
exon4 (const)	TNFRSF10B_e4_for	GAGCTAAGTCCCTGCACCAC
	TNFRSF10B_e4_for	CGGCACATCTCAGGAGAATC
exon1-exon3c	TNFRSF10B_e1_e3c_for	CGGTCCTGCTGTTGGACA
	TNFRSF10B_e3c_rev	GCAAGCAGAAAAGGAGGTCA
exon1-exon2	TNFRSF10B_e1_e2_for	CGGTCCTGCTGTTGGTCT
	TNFRSF10B_e2_rev	AGGTGGACACAATCCCTCTG
exon2-exon3c	TNFRSF10B_e2_e3c_for	TCCACCTGGACACCATATCTC
	TNFRSF10B_e3c_rev	GCAAGCAGAAAAGGAGGTCA
exon3 (const)	TNFRSF10B_e3c_for	TCTCAGAAGACGGTAGAGATTGC
	TNFRSF10B_e3c_rev	GCAAGCAGAAAAGGAGGTCA
<b>TRIB3</b>		NM_021158
Event	00037.0001.3	
Type of event	novel_exons	
Event	inclusion exon 1C	
	<b>Primers</b>	<b>sequence</b>
GE: exon 2	TRIB3ex_2F	TCCAGAAACGAGCTCGAAGT
	TRIB3ex_2R	TGCACGATCTGGAGCAGTAG
Probe E	TRIB3_e1_e2_F	GAACGACGGGGCGAGAT
	TRIB3_e2_R	CTTCGAGCTCGTTTCTGGAC
Probe D	TRIB3_e1C_e2_F	CTGCCTCACTTTCAGATGCG
	TRIB3_e2_R	CTTCGAGCTCGTTTCTGGAC
Probe B	TRIB3_e1C_F	ATGTTGAAACAGGCCTCCAG
	TRIB3_e1C_R	TGAGGCAGAGTTAGCCAGGT
Probe C	TRIB3_U2_e1C_F	TTGTGGGGGAAATTCACG
	TRIB3_e1C_R2	GGCCCTACTCCCAAAGTAGC
<b>U2AF35 / _U2AF1</b>		NM_006758
Event:	140.1.1	
Type of Event	novel_exons	
	<b>Primers</b>	<b>sequence</b>
GE:exon 2	140. exon1 Fge	ATCTTCGGCACCGAGAAAAG
	140. exon2 Rge	tggctaaacgtcggtttattg
probe C	140. exon1 Fge	ATCTTCGGCACCGAGAAAAG
	140-C1.1_4.2 R	CAAGATGGTctggctaaacg
probe D	140-2A F	CGTAATCCCCAAAACAGTGC
	140-3 R	cgtcagcagactgggaaga
E1.1C4	140. exon1 Fge	ATCTTCGGCACCGAGAAAAG
	140 E1.1/C4.1/E4.2 R	gcaatggctcggtctaaacgtc

<b>SFRS2</b>		NM_003016
Event:	38.1.4	
Type of Event	alt_splice_acceptor	
Primers		sequence
GE	38 exon1 Fge	caaggtggacaacctgacct
Probe E	38 exon2 Rge	gcgggactccttggtgtag
	38-E1.3_E1.4F	gtgtccaagaggggaatccaa
	38-E1.3_E1.4R	gctgccgatacatcatttc
Probe	38- D 1.3/C1.4F	GCAGGTTTGTCTTTAACTCTTAAATTG
	38- D 1.3/C1.4R	AAATGAAACATTTGGTAATTGAGAA
Probe D	38- D1.4F	CTGGTTTGACCAGAGCCTTAG
	38- D1.4R	gccgatacatCTAGGTTTGAAAAG
Probe	38- C1.3R	GGATTCCCAGACATTACcatttc
	38-E1.3_E1.4F	gtgtccaagaggggaatccaa
<b>QKI</b>		NM_206853
Event:	263.1.2	
Type of Event	alt_splice_donor	
Primers		sequence
GE	263-exon4 F	GGAGCAAAATAGAGGCAAGC
Probe C	263-exon4 R	TTCAATTTGATTTCTGCTCTGTTT
	263-C(855)-F	CCTAGTGGTGTATTAGGTAAGTTCTTC
Probe B	263-C(855)-R	TTGTCTTGCCTCTCTAAACTGA
	263-B1.3-F	CGGTCAGGGATATCATTGGT
Probe E	263-B1.3-R	AAAAAGGCTGCAACTTCTGC
	263-E1.1-F	GCCCGAAGCTGGTTTAATCT
Probe C	263-E1.1-R	AGCCACCGCACCTAATACAC
	263-C1.1-F	GCCCGAAGCTGGTTTAATCT
Probe B	263-C1.1-R	CGTTGGGAAAGCCATACCTA
	263-B1.2-F	ttccccagctaattcttcc
	263-B1.2-R	ccaactatctcaaggcactgg
<b>CASP9</b>		NM_001229
Event:	00049.0001.1	
Type of Event	exon(s)skipped	
Primers		sequence
GE	CASP9_Ex8GE_F	CTGGAGGGACCCCAAGAGT
Probe C	CASP9_Ex8GE_R	CCTAAGCAGGAGGGACTGC
	CASP9_jun 2-3_F	GACCAGAGATTGCGAAACCA
Probe D	CASP9_jun 2-3_R	AAACTCTCAAGAGCACCGACA
	CASP9_jun 6-7_F	TGTCGGTCGAGAAGATTGTG
Probe E	CASP9_jun 6-7_R	GTCTTTCTGCTCCCCACCAC
	CASP9_jun 2-7_F	TGGTGATGTCGAGCAGAA
	CASP9_jun 2-7_R	AAGGTCCTCAAACCTTCCTG

<b>BUB3</b>		NM_004725
Event:	87.2.1	
Type of Event	alt_splice_acceptor	
<b>Primers</b>		<b>sequence</b>
GE	87-EXON4 Fge	AATGCTGGGACCTTCTCTCA
	87-EXON5 Rge	TCCGTAAGTCCCACACCAAC
Probe E	Bub3 exon7-8 Forward	AAACAAAACCCAAGTCCACCT
	Bub3 exon7-8 Reverse	GACAGAAAACAGAGAAATCCACA
Probe B	Bub3 exon 8B-8A	TTTTGAAATGTATTTTCTTCATTGC
	Bub3 exon 8B-8A Reverse	GACAGAAAACAGAGAAATCCACA
Probe C	87-intron7(C)-F	CAAAACCCAAgtgagtatgttc
	87-intron7(C)-R	tatcgagcaggcatcaacaa
<b>C1QBP</b>		NM_001212
event:	73:1_10:3	-
type of event:	novel_exons	
<b>Primers</b>		<b>sequence</b>
exon2 (const.)	C1QBP_e2c_F	CAGAAGCATAAAACCCTCCCTA
GE	C1QBP_e2c_R	ATTCGCTTCTGTCCCATTC
exon2-exon3	C1QBP_e2c_F	CAGAAGCATAAAACCCTCCCTA
probe E	C1QBP_e2_e3_R	GAAAGTGACCGTGATTTTTTCC
exon2A-exon3	C1QBP_e2A_e3_F	CTGAGTAGCTGGGATTACAGAATC
probe D	C1QBP_e3_R	TTGGTGGGATGCTGTTGTTA
exon2A	C1QBP_e2A_F	GAGAGCAGTGGCGTGATCT
probe B	C1QBP_e2A_R	AGGCAGGAGAATTGCTTGAA
<b>AURKB</b>		NM_004217
Event:	00016.0033.1	-
Type of Event	novel_exons	
<b>Primers</b>		<b>sequence</b>
Probe E	AURKB_e2_e3_F	CCGACAGACGGCTCCA
exon2-exon3	AURKB_e3_R	GCTCATGAGGACAAGTGCAG
Probe D	AURKB_e2A_e3_F	AGTGACTCCCAGCTGGCTC
exon2A-exon3	AURKB_e3_R	GCTCATGAGGACAAGTGCAG
Probe B	AURKB_e2A_F	AAGTTTGACGACAGAACCCG
novel exon e2A	AURKB_e2A_R	TCACTGGCTGGTCAGATTCA
Probe C	AURKB_e2_e2A_F	GCCGACAGACGTACGGG
exon2-exon2A	AURKB_e2A_R	TCACTGGCTGGTCAGATTCA
exon 3c	AURKB_e3c_F	TCCATCTGGCCTGAGCAC
GE	AURKB_e3c_R	GCTCATGAGGACAAGTGCAG



<b>ATF2</b>		NM_001880
Event:	00326.0004.2	-
Type of Event	novel exon	
	<b>Primers</b>	<b>sequence</b>
GE: exon 13	ATF2_e13c_F	TCACCCTGCTGAGAAATGAA
	ATF2_e13c_R	TTCTTCTGCATGGCGGTTAC
probe C ex jun 12-12A	ATF_e12_F	AAGTGGTCGTCGGAGAAGAG
	ATF_e12_e12A_R	TTCACGAGCAATATATTCACTGC
probe D ex. Jun. 12A-13	ATF2_e12A_e13_F	TCCACAGACCAGAGTGAAGTC
	ATF2_e13c_R	TTCTTCTGCATGGCGGTTAC
Probe E ex. Jun. 12-13	ATF2_e12_e13_F	TGGTCAGCTGCAGAGTGAAG
	ATF2_e13c_R	TTCTTCTGCATGGCGGTTAC
probe B novel exon 12A	ATF2_e12A_F	TGAATATATTGCTCGTGAAAGGTG
	ATF2_e12A_R	TGGTCTGTGGATAATTAGAGTCCTT

## Referencias

- Adams, M. D., S. E. Celniker, et al. (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." Science **287**(5461): 2185-95.
- Akoulitchchev, S., S. Chuikov, et al. (2000). "TFIIH is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes." Nature **407**(6800): 102-6.
- Auboeuf, D., A. Honig, et al. (2002). "Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators." Science **298**(5592): 416-9.
- Baltimore, D. (2001). "Our genome unveiled." Nature **409**(6822): 814-6.
- Barnes, J. L., R. R. Hastings, et al. (1994). "Sequential expression of cellular fibronectin by platelets, macrophages, and mesangial cells in proliferative glomerulonephritis." Am J Pathol **145**(3): 585-97.
- Baskaran, R., M. E. Dahmus, et al. (1993). "Tyrosine phosphorylation of mammalian RNA polymerase II carboxyl-terminal domain." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(23): 11167-71.
- Batsche, E., M. Yaniv, et al. (2006). "The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing." Nat Struct Mol Biol **13**(1): 22-9.
- Bentley, D. L. (2005). "Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors." Curr. Opin. Cell Biol. **17**(3): 251-6.
- Bergamaschi, D., M. Gasco, et al. (2003). "p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis." Cancer Cell **3**(4): 387-402.
- Berget, S. M. (1995). "Exon recognition in vertebrate splicing." J Biol Chem **270**(6): 2411-4.
- Berget, S. M., C. Moore, et al. (1977). "Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(8): 3171-5.
- Bienkiewicz, E. A., A. Moon Woody, et al. (2000). "Conformation of the RNA polymerase II C-terminal domain: circular dichroism of long and short fragments." J Mol Biol **297**(1): 119-33.
- Bird, G., D. A. Zorio, et al. (2004). "RNA polymerase II carboxy-terminal domain phosphorylation is required for cotranscriptional pre-mRNA splicing and 3'-end formation." Mol. Cell. Biol. **24**(20): 8963-9.
- Black, D. L. (1995). "Finding splice sites within a wilderness of RNA." RNA **1**(8): 763-71.
- Black, D. L. (2000). "Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology." Cell **103**(3): 367-70.
- Black, D. L. (2003). "Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing." Annu Rev Biochem **72**: 291-336.
- Blattner, C., P. Kannouche, et al. (2000). "UV-Induced stabilization of c-fos and other short-lived mRNAs." Mol Cell Biol **20**(10): 3616-25.
- Blau, J., H. Xiao, et al. (1996). "Three functional classes of transcriptional activation domain." Mol. Cell. Biol. **16**(5): 2044-55.
- Blaustein, M., F. Pelisch, et al. (2004). "Mammary epithelial-mesenchymal interaction regulates fibronectin alternative splicing via phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem **279**(20): 21029-37.
- Blaustein, M., F. Pelisch, et al. (2005). "Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT." Nat Struct Mol Biol **12**(12): 1037-44.
- Boireau, S., P. Maiuri, et al. (2007). "The transcriptional cycle of HIV-1 in real-time and live cells." J Cell Biol **179**(2): 291-304.
- Boise, L. H., M. Gonzalez-Garcia, et al. (1993). "bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death." Cell **74**(4): 597-608.
- Boon-Unge, K., Q. Yu, et al. (2007). "Emetine regulates the alternative splicing of Bcl-x through a protein phosphatase 1-dependent mechanism." Chem Biol **14**(12): 1386-92.
- Borggrefe, T., R. Davis, et al. (2002). "A complex of the Srb8, -9, -10, and -11 transcriptional regulatory proteins from yeast." J Biol Chem **277**(46): 44202-7.

- Boube, M., L. Joulia, et al. (2002). "Evidence for a mediator of RNA polymerase II transcriptional regulation conserved from yeast to man." *Cell* **110**(2): 143-51.
- Bregman, D. B., L. Du, et al. (1995). "Transcription-dependent redistribution of the large subunit of RNA polymerase II to discrete nuclear domains." *J Cell Biol* **129**(2): 287-98.
- Bregman, D. B., R. Halaban, et al. (1996). "UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11586-90.
- Bregman, D. B., R. G. Pestell, et al. (2000). "Cell cycle regulation and RNA polymerase II." *Front Biosci* **5**: D244-57.
- Brody, E. and J. Abelson (1985). "The "spliceosome": yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction." *Science* **228**(4702): 963-7.
- Brown, L. F., D. Dubin, et al. (1993). "Macrophages and fibroblasts express embryonic fibronectins during cutaneous wound healing." *Am J Pathol* **142**(3): 793-801.
- Buermeyer, A. B., N. E. Thompson, et al. (1992). "The HIP1 initiator element plays a role in determining the in vitro requirement of the dihydrofolate reductase gene promoter for the C-terminal domain of RNA polymerase II." *Mol Cell Biol* **12**(5): 2250-9.
- Buratowski, S. (2003). "The CTD code." *Nat. Struct. Biol.* **10**(9): 679-80.
- Buratti, E., A. F. Muro, et al. (2004). "RNA folding affects the recruitment of SR proteins by mouse and human polypurinic enhancer elements in the fibronectin EDA exon." *Mol Cell Biol* **24**(3): 1387-400.
- Caceres, J. F. and A. R. Kornblihtt (2002). "Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease." *Trends Genet* **18**(4): 186-93.
- Caceres, J. F., S. Stamm, et al. (1994). "Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors." *Science* **265**(5179): 1706-9.
- Cadena, D. L. and M. E. Dahmus (1987). "Messenger RNA synthesis in mammalian cells is catalyzed by the phosphorylated form of RNA polymerase II." *J Biol Chem* **262**(26): 12468-74.
- Calarco, J. A., Y. Xing, et al. (2007). "Global analysis of alternative splicing differences between humans and chimpanzees." *Genes Dev* **21**(22): 2963-75.
- Caputi, M., G. Casari, et al. (1994). "A novel bipartite splicing enhancer modulates the differential processing of the human fibronectin EDA exon." *Nucleic Acids Res.* **22**(6): 1018-22.
- Caputi, M. and A. M. Zahler (2002). "SR proteins and hnRNP H regulate the splicing of the HIV-1 tev-specific exon 6D." *EMBO J* **21**(4): 845-55.
- Cartegni, L., S. L. Chew, et al. (2002). "Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing." *Nat Rev Genet* **3**(4): 285-98.
- Chabot, B., S. Bisotto, et al. (1995). "The nuclear matrix phosphoprotein p255 associates with splicing complexes as part of the [U4/U6.U5] tri-snRNP particle." *Nucleic Acids Res* **23**(16): 3206-13.
- Chalfant, C. E., K. Rathman, et al. (2002). "De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1." *J Biol Chem* **277**(15): 12587-95.
- Chandler, D. S., R. K. Singh, et al. (2006). "Genotoxic stress induces coordinately regulated alternative splicing of the p53 modulators MDM2 and MDM4." *Cancer Res* **66**(19): 9502-8.
- Chapman, R. D., M. Heidemann, et al. (2007). "Transcribing RNA polymerase II is phosphorylated at CTD residue serine-7." *Science* **318**(5857): 1780-2.
- Chauhan, A. K., F. A. Moretti, et al. (2005). "Impaired motor coordination in mice lacking the EDA exon of the fibronectin gene." *Behav Brain Res* **161**(1): 31-8.
- Chen, R., M. Liu, et al. (2008). "PP2B and PP1alpha cooperatively disrupt 7SK snRNP to release P-TEFb for transcription in response to Ca<sup>2+</sup> signaling." *Genes Dev* **22**(10): 1356-68.
- Cheng, C. and P. A. Sharp (2003). "RNA polymerase II accumulation in the promoter-proximal region of the dihydrofolate reductase and gamma-actin genes." *Mol Cell Biol* **23**(6): 1961-7.
- Chesnut, J. D., J. H. Stephens, et al. (1992). "The interaction of RNA polymerase II with the adenovirus-2 major late promoter is precluded by phosphorylation of the C-terminal domain of subunit IIa." *J Biol Chem* **267**(15): 10500-6.
- Chow, L. T., R. E. Gelinas, et al. (1977). "An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA." *Cell* **12**(1): 1-8.

- Christmann, J. L. and M. E. Dahmus (1981). "Monoclonal antibody specific for calf thymus RNA polymerases IIO and IIA." *J Biol Chem* **256**(22): 11798-803.
- Cline, S. D. and P. C. Hanawalt (2003). "Who's on first in the cellular response to DNA damage?" *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(5): 361-72.
- Coin, F., V. Oksenychn, et al. (2008). "Nucleotide excision repair driven by the dissociation of CAK from TFIIH." *Mol Cell* **31**(1): 9-20.
- Conaway, J. W. and R. C. Conaway (1999). "Transcription elongation and human disease." *Annu Rev Biochem* **68**: 301-19.
- Connelly, S. and J. L. Manley (1988). "A functional mRNA polyadenylation signal is required for transcription termination by RNA polymerase II." *Genes Dev* **2**(4): 440-52.
- Coulter, D. E. and A. L. Greenleaf (1985). "A mutation in the largest subunit of RNA polymerase II alters RNA chain elongation in vitro." *J Biol Chem* **260**(24): 13190-8.
- Cramer, P., D. A. Bushnell, et al. (2001). "Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution." *Science* **292**(5523): 1863-76.
- Cramer, P., J. F. Caceres, et al. (1999). "Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer." *Mol. Cell* **4**(2): 251-8.
- Cramer, P., C. G. Pesce, et al. (1997). "Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**(21): 11456-60.
- Cui, R., H. R. Widlund, et al. (2007). "Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation." *Cell* **128**(5): 853-64.
- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." *Cell* **116**(2): 205-19.
- Darzacq, X., Y. Shav-Tal, et al. (2007). "In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription." *Nat Struct Mol Biol* **14**(9): 796-806.
- Das, R., K. Dufu, et al. (2006). "Functional coupling of RNAP II transcription to spliceosome assembly." *Genes Dev.* **20**(9): 1100-9.
- Das, R., J. Yu, et al. (2007). "SR proteins function in coupling RNAP II transcription to pre-mRNA splicing." *Mol Cell* **26**(6): 867-81.
- Das, R., Z. Zhou, et al. (2000). "Functional association of U2 snRNP with the ATP-independent spliceosomal complex E." *Mol Cell* **5**(5): 779-87.
- David, C. J. and J. L. Manley (2008). "The search for alternative splicing regulators: new approaches offer a path to a splicing code." *Genes Dev* **22**(3): 279-85.
- de la Mata, M., C. R. Alonso, et al. (2003). "A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo." *Mol. Cell* **12**(2): 525-32.
- de la Mata, M. and A. R. Kornblihtt (2006). "RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20." *Nat Struct Mol Biol* **13**(11): 973-980.
- Dias, C. S., Y. Liu, et al. (2006). "Regulation of hdm2 by stress-induced hdm2alt1 in tumor and nontumorigenic cell lines correlating with p53 stability." *Cancer Res* **66**(19): 9467-73.
- Drapkin, R., J. T. Reardon, et al. (1994). "Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II." *Nature* **368**(6473): 769-72.
- Du, L. and S. L. Warren (1997). "A functional interaction between the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and pre-mRNA splicing." *J. Cell Biol.* **136**(1): 5-18.
- Dvir, A., R. C. Conaway, et al. (1996). "Promoter escape by RNA polymerase II. A role for an ATP cofactor in suppression of arrest by polymerase at promoter-proximal sites." *J Biol Chem* **271**(38): 23352-6.
- Dynlacht, B. D. (1997). "Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle." *Nature* **389**(6647): 149-52.
- Efeyan, A. and M. Serrano (2007). "p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes." *Cell Cycle* **6**(9): 1006-10.
- Egloff, S., D. O'Reilly, et al. (2007). "Serine-7 of the RNA polymerase II CTD is specifically required for snRNA gene expression." *Science* **318**(5857): 1777-9.
- Eperon, L. P., I. R. Graham, et al. (1988). "Effects of RNA secondary structure on alternative splicing of pre-mRNA: is folding limited to a region behind the transcribing RNA polymerase?" *Cell* **54**(3): 393-401.

- Espinosa, J. M. (2008). "Mechanisms of regulatory diversity within the p53 transcriptional network." *Oncogene* **27**(29): 4013-23.
- Espinosa, J. M., R. E. Verdun, et al. (2003). "p53 functions through stress- and promoter-specific recruitment of transcription initiation components before and after DNA damage." *Mol Cell* **12**(4): 1015-27.
- Fadeel, B., B. Gleiss, et al. (1999). "Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression." *Biochem Biophys Res Commun* **266**(2): 504-11.
- Fesik, S. W. (2005). "Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery." *Nat Rev Cancer* **5**(11): 876-85.
- Fink, S. L. and B. T. Cookson (2005). "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells." *Infect Immun* **73**(4): 1907-16.
- Fong, Y. W. and Q. Zhou (2001). "Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation." *Nature* **414**(6866): 929-33.
- Fousteri, M., W. Vermeulen, et al. (2006). "Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo." *Mol Cell* **23**(4): 471-82.
- Fox-Walsh, K. L., Y. Dou, et al. (2005). "The architecture of pre-mRNAs affects mechanisms of splice-site pairing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(45): 16176-81.
- Gentile, M., L. Latonen, et al. (2003). "Cell cycle arrest and apoptosis provoked by UV radiation-induced DNA damage are transcriptionally highly divergent responses." *Nucleic Acids Res* **31**(16): 4779-90.
- George, E. L., E. N. Georges-Labouesse, et al. (1993). "Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin." *Development* **119**(4): 1079-91.
- Gerber, H. P., M. Hagmann, et al. (1995). "RNA polymerase II C-terminal domain required for enhancer-driven transcription." *Nature* **374**(6523): 660-2.
- Glover-Cutter, K., S. Kim, et al. (2008). "RNA polymerase II pauses and associates with pre-mRNA processing factors at both ends of genes." *Nat Struct Mol Biol* **15**(1): 71-8.
- Gomes, N. P., G. Bjerke, et al. (2006). "Gene-specific requirement for P-TEFb activity and RNA polymerase II phosphorylation within the p53 transcriptional program." *Genes Dev* **20**(5): 601-12.
- Goodrich, J. A. and R. Tjian (1994). "Transcription factors IIE and IIH and ATP hydrolysis direct promoter clearance by RNA polymerase II." *Cell* **77**(1): 145-56.
- Gornemann, J., K. M. Kotovic, et al. (2005). "Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex." *Mol Cell* **19**(1): 53-63.
- Gossen, M. and H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**(12): 5547-51.
- Graveley, B. R. (2000). "Sorting out the complexity of SR protein functions." *Rna* **6**(9): 1197-211.
- Graveley, B. R. (2001). "Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world." *Trends Genet* **17**(2): 100-7.
- Graveley, B. R. (2009). "Alternative splicing: regulation without regulators." *Nat Struct Mol Biol* **16**(1): 13-5.
- Hahn, S. (2004). "Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery." *Nat Struct Mol Biol* **11**(5): 394-403.
- Hainaut, P. and M. Hollstein (2000). "p53 and human cancer: the first ten thousand mutations." *Adv Cancer Res* **77**: 81-137.
- Hanamura, A., J. F. Cáceres, et al. (1998). "Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors." *RNA* **4**(4): 430-44.
- Hanawalt, P. C. (2002). "Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation." *Oncogene* **21**(58): 8949-56.
- Hanawalt, P. C. (2008). "Emerging links between premature ageing and defective DNA repair." *Mech Ageing Dev* **129**(7-8): 503-5.
- Hanawalt, P. C. and G. Spivak (2008). "Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(12): 958-70.

- Harper, J. W. and S. J. Elledge (1998). "The role of Cdk7 in CAK function, a retro-retrospective." Genes Dev **12**(3): 285-9.
- Harrison, P. M., A. Kumar, et al. (2002). "A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it." Nucleic Acids Res **30**(5): 1083-90.
- Hartzog, G. A., T. Wada, et al. (1998). "Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*." Genes Dev **12**(3): 357-69.
- Hengartner, C. J., V. E. Myer, et al. (1998). "Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases." Mol Cell **2**(1): 43-53.
- Hicks, M. J., C. R. Yang, et al. (2006). "Linking splicing to Pol II transcription stabilizes pre-mRNAs and influences splicing patterns." PLoS Biol **4**(6): e147.
- Hirose, Y. and J. L. Manley (2000). "RNA polymerase II and the integration of nuclear events." Genes Dev. **14**(12): 1415-29.
- Hoffman, B. E. and P. J. Grabowski (1992). "U1 snRNP targets an essential splicing factor, U2AF65, to the 3' splice site by a network of interactions spanning the exon." Genes Dev **6**(12B): 2554-68.
- Holstege, F. C., E. G. Jennings, et al. (1998). "Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome." Cell **95**(5): 717-28.
- Horowitz, D. S. and A. R. Krainer (1994). "Mechanisms for selecting 5' splice sites in mammalian pre-mRNA splicing." Trends Genet **10**(3): 100-6.
- Hossini, A. M., J. Eberle, et al. (2003). "Conditional expression of exogenous Bcl-X(S) triggers apoptosis in human melanoma cells in vitro and delays growth of melanoma xenografts." FEBS Lett **553**(3): 250-6.
- Hutchins, J. B. and S. W. Barger (1998). "Why neurons die: cell death in the nervous system." Anat Rec **253**(3): 79-90.
- Ip, J. Y., A. Tong, et al. (2007). "Global analysis of alternative splicing during T-cell activation." RNA **13**(4): 563-72.
- Irwin, M. S., K. Kondo, et al. (2003). "Chemosensitivity linked to p73 function." Cancer Cell **3**(4): 403-10.
- Jiang, Y. and J. D. Gralla (1993). "Uncoupling of initiation and reinitiation rates during HeLa RNA polymerase II transcription in vitro." Mol Cell Biol **13**(8): 4572-7.
- Jones, J. C., H. P. Phatnani, et al. (2004). "C-terminal repeat domain kinase I phosphorylates Ser2 and Ser5 of RNA polymerase II C-terminal domain repeats." J Biol Chem **279**(24): 24957-64.
- Kadener, S., P. Cramer, et al. (2001). "Antagonistic effects of T-Ag and VP16 reveal a role for RNA pol II elongation on alternative splicing." EMBO J. **20**(20): 5759-68.
- Kaldis, P. (1999). "The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals." Cell Mol Life Sci **55**(2): 284-96.
- Kamura, T., D. Burian, et al. (2001). "Muf1, a novel Elongin BC-interacting leucine-rich repeat protein that can assemble with Cul5 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase." J Biol Chem **276**(32): 29748-53.
- Kan, J. L. and M. R. Green (1999). "Pre-mRNA splicing of IgM exons M1 and M2 is directed by a juxtaposed splicing enhancer and inhibitor." Genes Dev **13**(4): 462-71.
- Kanai, A., T. Kuzuhara, et al. (1991). "Heterogeneity and tissue-specific expression of eukaryotic transcription factor S-II-related protein mRNA." J Biochem **109**(5): 674-7.
- Kang, M. E. and M. E. Dahmus (1993). "RNA polymerases IIA and IIO have distinct roles during transcription from the TATA-less murine dihydrofolate reductase promoter." J Biol Chem **268**(33): 25033-40.
- Karni, R., E. de Stanchina, et al. (2007). "The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene." Nat Struct Mol Biol **14**(3): 185-93.
- Katzenberger, R. J., M. S. Marengo, et al. (2006). "ATM and ATR pathways signal alternative splicing of *Drosophila* TAF1 pre-mRNA in response to DNA damage." Mol Cell Biol **26**(24): 9256-67.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- Kim, E., L. Du, et al. (1997). "Splicing factors associate with hyperphosphorylated RNA polymerase II in the absence of pre-mRNA." J. Cell Biol. **136**(1): 19-28.
- Kim, E., A. Magen, et al. (2007). "Different levels of alternative splicing among eukaryotes." Nucleic Acids Res **35**(1): 125-31.



- Kim, J. H., W. S. Lane, et al. (2002). "Human Elongator facilitates RNA polymerase II transcription through chromatin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(3): 1241-6.
- Kim, T. H., L. O. Barrera, et al. (2005). "A high-resolution map of active promoters in the human genome." *Nature* **436**(7052): 876-80.
- Kleiman, F. E., F. Wu-Baer, et al. (2005). "BRCA1/BARD1 inhibition of mRNA 3' processing involves targeted degradation of RNA polymerase II." *Genes Dev* **19**(10): 1227-37.
- Kobor, M. S. and J. Greenblatt (2002). "Regulation of transcription elongation by phosphorylation." *Biochim. Biophys. Acta* **1577**(2): 261-275.
- Kohtz, J. D., S. F. Jamison, et al. (1994). "Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors." *Nature* **368**(6467): 119-24.
- Komarnitsky, P., E. J. Cho, et al. (2000). "Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription." *Genes Dev* **14**(19): 2452-60.
- Komarnitsky, P., E. J. Cho, et al. (2000). "Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription." *Genes Dev.* **14**(19): 2452-60.
- Kong, S. E., M. S. Kobor, et al. (2005). "Interaction of Fcp1 phosphatase with elongating RNA polymerase II holoenzyme, enzymatic mechanism of action, and genetic interaction with elongator." *J Biol Chem* **280**(6): 4299-306.
- Kornblihtt, A. R. (2004). "Shortcuts to the end." *Nat Struct Mol Biol* **11**(12): 1156-7.
- Kornblihtt, A. R., M. de la Mata, et al. (2004). "Multiple links between transcription and splicing." *RNA* **10**(10): 1489-98.
- Kornblihtt, A. R., C. G. Pesce, et al. (1996). "The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies." *FASEB J.* **10**(2): 248-57.
- Kornblihtt, A. R., K. Vibe-Pedersen, et al. (1984). "Human fibronectin: molecular cloning evidence for two mRNA species differing by an internal segment coding for a structural domain." *Embo J* **3**(1): 221-6.
- Kotovic, K. M., D. Lockshon, et al. (2003). "Cotranscriptional recruitment of the U1 snRNP to intron-containing genes in yeast." *Mol Cell Biol* **23**(16): 5768-79.
- Kravchenko, J. E., I. B. Rogozin, et al. (2005). "Transcription of mammalian messenger RNAs by a nuclear RNA polymerase of mitochondrial origin." *Nature* **436**(7051): 735-9.
- Krecic, A. M. and M. S. Swanson (1999). "hnRNP complexes: composition, structure, and function." *Curr Opin Cell Biol* **11**(3): 363-71.
- Lacadie, S. A. and M. Rosbash (2005). "Cotranscriptional spliceosome assembly dynamics and the role of U1 snRNA:5'ss base pairing in yeast." *Mol Cell* **19**(1): 65-75.
- Lamond, A. I. and D. L. Spector (2003). "Nuclear speckles: a model for nuclear organelles." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(8): 605-12.
- Lander, E. S., L. M. Linton, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* **409**(6822): 860-921.
- Larochelle, S., K. A. Merrick, et al. (2007). "Requirements for Cdk7 in the assembly of Cdk1/cyclin B and activation of Cdk2 revealed by chemical genetics in human cells." *Mol Cell* **25**(6): 839-50.
- Latonen, L. and M. Laiho (2005). "Cellular UV damage responses--functions of tumor suppressor p53." *Biochim Biophys Acta* **1755**(2): 71-89.
- Laurencikienė, J., A. M. Kallman, et al. (2006). "RNA editing and alternative splicing: the importance of co-transcriptional coordination." *EMBO Rep.* **7**(3): 303-7.
- Lavigne, A., H. La Branche, et al. (1993). "A splicing enhancer in the human fibronectin alternate ED1 exon interacts with SR proteins and stimulates U2 snRNP binding." *Genes Dev* **7**(12A): 2405-17.
- Laybourn, P. J. and M. E. Dahmus (1989). "Transcription-dependent structural changes in the C-terminal domain of mammalian RNA polymerase subunit IIa/o." *J Biol Chem* **264**(12): 6693-8.
- Lazarev, D. and J. L. Manley (2007). "Concurrent splicing and transcription are not sufficient to enhance splicing efficiency." *RNA* **13**(9): 1546-57.
- Leist, M. and M. Jaattela (2001). "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(8): 589-98.
- Lejeune, F. and L. E. Maquat (2005). "Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells." *Curr Opin Cell Biol* **17**(3): 309-15.

- Levine, M. and R. Tjian (2003). "Transcription regulation and animal diversity." *Nature* **424**(6945): 147-51.
- Lewis, J. D., E. Izaurralde, et al. (1996). "A nuclear cap-binding complex facilitates association of U1 snRNP with the cap-proximal 5' splice site." *Genes Dev* **10**(13): 1683-98.
- Lin, P. S., N. F. Marshall, et al. (2002). "CTD phosphatase: role in RNA polymerase II cycling and the regulation of transcript elongation." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**: 333-65.
- Lis, J. (1998). "Promoter-associated pausing in promoter architecture and postinitiation transcriptional regulation." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**: 347-56.
- Listerman, I., A. K. Sapra, et al. (2006). "Co-transcriptional coupling of splicing factor recruitment and pre-mRNA splicing in mammalian cells."
- Liu, Y., C. Kung, et al. (2004). "Two cyclin-dependent kinases promote RNA polymerase II transcription and formation of the scaffold complex." *Mol Cell Biol* **24**(4): 1721-35.
- Liu, Y., J. A. Ranish, et al. (2001). "Yeast nuclear extract contains two major forms of RNA polymerase II mediator complexes." *J Biol Chem* **276**(10): 7169-75.
- Ljungman, M. (2005). "Activation of DNA damage signaling." *Mutat Res* **577**(1-2): 203-16.
- Ljungman, M., F. Zhang, et al. (1999). "Inhibition of RNA polymerase II as a trigger for the p53 response." *Oncogene* **18**(3): 583-92.
- Lockshin, R. A. and Z. Zakeri (2001). "Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(7): 545-50.
- Lu, H., O. Flores, et al. (1991). "The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22): 10004-8.
- Luo, W. and D. Bentley (2004). "A ribonucleolytic rat torpedo RNA polymerase II." *Cell* **119**(7): 911-4.
- Luo, X., I. Budihardjo, et al. (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." *Cell* **94**(4): 481-90.
- Luo, Z., J. Zheng, et al. (2001). "Ultraviolet radiation alters the phosphorylation of RNA polymerase II large subunit and accelerates its proteasome-dependent degradation." *Mutat Res* **486**(4): 259-74.
- Mandal, S. S., C. Chu, et al. (2004). "Functional interactions of RNA-capping enzyme with factors that positively and negatively regulate promoter escape by RNA polymerase II." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(20): 7572-7.
- Maniatis, T. and R. Reed (2002). "An extensive network of coupling among gene expression machines." *Nature* **416**(6880): 499-506.
- Maniatis, T. and B. Tasic (2002). "Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans." *Nature* **418**(6894): 236-43.
- Marshall, N. F., J. Peng, et al. (1996). "Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase." *J Biol Chem* **271**(43): 27176-83.
- Marshall, N. F. and D. H. Price (1992). "Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes." *Mol Cell Biol* **12**(5): 2078-90.
- Marshall, N. F. and D. H. Price (1995). "Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation." *J Biol Chem* **270**(21): 12335-8.
- Mason, P. B. and K. Struhl (2005). "Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II in vivo." *Mol. Cell* **17**(6): 831-40.
- Matsuoka, S., B. A. Ballif, et al. (2007). "ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage." *Science* **316**(5828): 1160-6.
- Mayeda, A. and A. R. Krainer (1992). "Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2." *Cell* **68**(2): 365-75.
- Mayne, L. V. and A. R. Lehmann (1982). "Failure of RNA synthesis to recover after UV irradiation: an early defect in cells from individuals with Cockayne's syndrome and xeroderma pigmentosum." *Cancer Res* **42**(4): 1473-8.
- McCracken, S., N. Fong, et al. (1997). "5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II." *Genes Dev* **11**(24): 3306-18.
- McCracken, S., N. Fong, et al. (1997). "The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription." *Nature* **385**(6614): 357-61.



- McCracken, S., E. Rosonina, et al. (1998). "Role of RNA polymerase II carboxy-terminal domain in coordinating transcription with RNA processing." *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **63**: 301-9.
- McCullough, A. J. and S. M. Berget (1997). "G triplets located throughout a class of small vertebrate introns enforce intron borders and regulate splice site selection." *Mol Cell Biol* **17**(8): 4562-71.
- Meier, P., A. Finch, et al. (2000). "Apoptosis in development." *Nature* **407**(6805): 796-801.
- Meinhart, A., T. Kamenski, et al. (2005). "A structural perspective of CTD function." *Genes Dev* **19**(12): 1401-15.
- Meininghaus, M., R. D. Chapman, et al. (2000). "Conditional expression of RNA polymerase II in mammalian cells. Deletion of the carboxyl-terminal domain of the large subunit affects early steps in transcription." *J. Biol. Chem.* **275**(32): 24375-82.
- Mercatante, D. R., C. D. Bortner, et al. (2001). "Modification of alternative splicing of Bcl-x pre-mRNA in prostate and breast cancer cells. analysis of apoptosis and cell death." *J Biol Chem* **276**(19): 16411-7.
- Merdzhanova, G., V. Edmond, et al. (2008). "E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35." *Cell Death Differ* **15**(12): 1815-23.
- Misteli, T. (2000). "Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function." *J Cell Sci* **113** ( Pt 11): 1841-9.
- Misteli, T., J. F. Caceres, et al. (1997). "The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells." *Nature* **387**(6632): 523-7.
- Misteli, T. and D. L. Spector (1996). "Serine/threonine phosphatase 1 modulates the subnuclear distribution of pre-mRNA splicing factors." *Mol Biol Cell* **7**(10): 1559-72.
- Misteli, T. and D. L. Spector (1999). "RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo." *Mol. Cell* **3**(6): 697-705.
- Mitchell, J. R., J. H. Hoeijmakers, et al. (2003). "Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing." *Curr Opin Cell Biol* **15**(2): 232-40.
- Moen, P. T., Jr., C. V. Johnson, et al. (2004). "Repositioning of muscle-specific genes relative to the periphery of SC-35 domains during skeletal myogenesis." *Mol Biol Cell* **15**(1): 197-206.
- Monsalve, M., Z. Wu, et al. (2000). "Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1." *Mol Cell* **6**(2): 307-16.
- Mortillaro, M. J., B. J. Blencowe, et al. (1996). "A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**(16): 8253-7.
- Mullenders, L. H. (1998). "Transcription response and nucleotide excision repair." *Mutat Res* **409**(2): 59-64.
- Muller, F., M. A. Demeny, et al. (2007). "New problems in RNA polymerase II transcription initiation: matching the diversity of core promoters with a variety of promoter recognition factors." *J Biol Chem* **282**(20): 14685-9.
- Muratani, M. and W. P. Tansey (2003). "How the ubiquitin-proteasome system controls transcription." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(3): 192-201.
- Muro, A. F., A. K. Chauhan, et al. (2003). "Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan." *J Cell Biol* **162**(1): 149-60.
- Murray, A. W. (2004). "Recycling the cell cycle: cyclins revisited." *Cell* **116**(2): 221-34.
- Neugebauer, K. M. (2002). "On the importance of being co-transcriptional." *J Cell Sci* **115**(Pt 20): 3865-71.
- Nguyen, V. T., F. Giannoni, et al. (1996). "In vivo degradation of RNA polymerase II largest subunit triggered by alpha-amanitin." *Nucleic Acids Res* **24**(15): 2924-9.
- Nguyen, V. T., T. Kiss, et al. (2001). "7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes." *Nature* **414**(6861): 322-5.
- Nicholls, C. D., M. A. Shields, et al. (2004). "UV-dependent alternative splicing uncouples p53 activity and PIG3 gene function through rapid proteolytic degradation." *J Biol Chem* **279**(23): 24171-8.
- Nogues, G., S. Kadener, et al. (2002). "Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing." *J. Biol. Chem.* **277**(45): 43110-4.
- Norton, P. A. and R. O. Hynes (1987). "Alternative splicing of chicken fibronectin in embryos and in normal and transformed cells." *Mol Cell Biol* **7**(12): 4297-307.

- O'Brien, T., S. Hardin, et al. (1994). "Phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain and transcriptional elongation." *Nature* **370**(6484): 75-7.
- Ohno, M., H. Sakamoto, et al. (1987). "Preferential excision of the 5' proximal intron from mRNA precursors with two introns as mediated by the cap structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(15): 5187-91.
- Orlova, M., J. Newlands, et al. (1995). "Intrinsic transcript cleavage activity of RNA polymerase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10): 4596-600.
- Orphanides, G. and D. Reinberg (2000). "RNA polymerase II elongation through chromatin." *Nature* **407**(6803): 471-5.
- Orphanides, G. and D. Reinberg (2002). "A unified theory of gene expression." *Cell* **108**(4): 439-51.
- Otero, G., J. Fellows, et al. (1999). "Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation." *Mol Cell* **3**(1): 109-18.
- Oyama, F., S. Hirohashi, et al. (1989). "Deregulation of alternative splicing of fibronectin pre-mRNA in malignant human liver tumors." *J Biol Chem* **264**(18): 10331-4.
- Pagani, F. and F. E. Baralle (2004). "Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers." *Nat Rev Genet* **5**(5): 389-96.
- Pal, M. and D. S. Luse (2003). "The initiation-elongation transition: lateral mobility of RNA in RNA polymerase II complexes is greatly reduced at +8/+9 and absent by +23." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10): 5700-5.
- Palancade, B. and O. Bensaude (2003). "Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation." *Eur. J. Biochem.* **270**(19): 3859-70.
- Pan, Q., O. Shai, et al. (2008). "Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing." *Nat Genet* **40**(12): 1413-5.
- Pan, Q., O. Shai, et al. (2004). "Revealing global regulatory features of mammalian alternative splicing using a quantitative microarray platform." *Mol Cell* **16**(6): 929-41.
- Payne, J. M., P. J. Laybourn, et al. (1989). "The transition of RNA polymerase II from initiation to elongation is associated with phosphorylation of the carboxyl-terminal domain of subunit IIa." *J Biol Chem* **264**(33): 19621-9.
- Pearson, J. L., T. J. Robinson, et al. (2008). "Identification of the cellular targets of the transcription factor TCERG1 reveals a prevalent role in mRNA processing." *J Biol Chem* **283**(12): 7949-61.
- Peterlin, B. M. and D. H. Price (2006). "Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb." *Mol Cell* **23**(3): 297-305.
- Petersen, T. E., H. C. Thogersen, et al. (1983). "Partial primary structure of bovine plasma fibronectin: three types of internal homology." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(1): 137-41.
- Phatnani, H. P. and A. L. Greenleaf (2006). "Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD." *Genes Dev* **20**(21): 2922-36.
- Prasad, J., K. Colwill, et al. (1999). "The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing." *Mol. Cell. Biol.* **19**(10): 6991-7000.
- Price, D. H. (2000). "P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II." *Mol Cell Biol* **20**(8): 2629-34.
- Proudfoot, N. J. (1989). "How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes." *Trends Biochem Sci* **14**(3): 105-10.
- Proudfoot, N. J., A. Furger, et al. (2002). "Integrating mRNA processing with transcription." *Cell* **108**(4): 501-12.
- Ratner, J. N., B. Balasubramanian, et al. (1998). "Ultraviolet radiation-induced ubiquitination and proteasomal degradation of the large subunit of RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair." *J Biol Chem* **273**(9): 5184-9.
- Revil, T., J. Toutant, et al. (2007). "Protein kinase C-dependent control of Bcl-x alternative splicing." *Mol Cell Biol* **27**(24): 8431-41.
- Rieger, K. E. and G. Chu (2004). "Portrait of transcriptional responses to ultraviolet and ionizing radiation in human cells." *Nucleic Acids Res* **32**(16): 4786-803.
- Riley, T., E. Sontag, et al. (2008). "Transcriptional control of human p53-regulated genes." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(5): 402-12.

- Robberson, B. L., G. J. Cote, et al. (1990). "Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons." *Mol Cell Biol* **10**(1): 84-94.
- Roberts, G. C., C. Gooding, et al. (1998). "Co-transcriptional commitment to alternative splice site selection." *Nucleic Acids Res.* **26**(24): 5568-72.
- Robson-Dixon, N. D. and M. A. Garcia-Blanco (2004). "MAZ elements alter transcription elongation and silencing of the fibroblast growth factor receptor 2 exon IIIb." *J Biol Chem* **279**(28): 29075-84.
- Rockx, D. A., R. Mason, et al. (2000). "UV-induced inhibition of transcription involves repression of transcription initiation and phosphorylation of RNA polymerase II." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(19): 10503-8.
- Roeder, R. G. and W. J. Rutter (1969). "Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms." *Nature* **224**(5216): 234-7.
- Roos, W. P. and B. Kaina (2006). "DNA damage-induced cell death by apoptosis." *Trends Mol Med* **12**(9): 440-50.
- Rosonina, E., M. A. Bakowski, et al. (2003). "Transcriptional activators control splicing and 3'-end cleavage levels." *J Biol Chem* **278**(44): 43034-40.
- Rudd, M. D., M. G. Izban, et al. (1994). "The active site of RNA polymerase II participates in transcript cleavage within arrested ternary complexes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(17): 8057-61.
- Ruvkun, G. and O. Hobert (1998). "The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans*." *Science* **282**(5396): 2033-41.
- Samuelsen, C. O., V. Baraznenok, et al. (2003). "TRAP230/ARC240 and TRAP240/ARC250 Mediator subunits are functionally conserved through evolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(11): 6422-7.
- Sanford, J. R., N. K. Gray, et al. (2004). "A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation." *Genes Dev* **18**(7): 755-68.
- Saraste, A. and K. Pulkki (2000). "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis." *Cardiovasc Res* **45**(3): 528-37.
- Sarkaria, J. N., E. C. Busby, et al. (1999). "Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine." *Cancer Res* **59**(17): 4375-82.
- Sarker, A. H., S. E. Tsutakawa, et al. (2005). "Recognition of RNA polymerase II and transcription bubbles by XPG, CSB, and TFIIH: insights for transcription-coupled repair and Cockayne Syndrome." *Mol Cell* **20**(2): 187-98.
- Saunders, A., L. J. Core, et al. (2006). "Breaking barriers to transcription elongation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(8): 557-67.
- Schroeder, S. C., B. Schwer, et al. (2000). "Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II." *Genes Dev* **14**(19): 2435-40.
- Schwerk, C. and K. Schulze-Osthoff (2005). "Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing." *Mol Cell* **19**(1): 1-13.
- Sekimizu, K., N. Kobayashi, et al. (1976). "Purification of a factor from Ehrlich ascites tumor cells specifically stimulating RNA polymerase II." *Biochemistry* **15**(23): 5064-70.
- Seol, D. W. and T. R. Billiar (1999). "A caspase-9 variant missing the catalytic site is an endogenous inhibitor of apoptosis." *J Biol Chem* **274**(4): 2072-6.
- Shilatifard, A., R. C. Conaway, et al. (2003). "The RNA polymerase II elongation complex." *Annu Rev Biochem* **72**: 693-715.
- Shomron, N., M. Alberstein, et al. (2005). "Stress alters the subcellular distribution of hSlu7 and thus modulates alternative splicing." *J Cell Sci* **118**(Pt 6): 1151-9.
- Shopland, L. S., C. V. Johnson, et al. (2003). "Clustering of multiple specific genes and gene-rich R-bands around SC-35 domains: evidence for local euchromatic neighborhoods." *J Cell Biol* **162**(6): 981-90.
- Short, N. J. (1987). "Regulation of transcription. Are some controlling factors more equal than others?" *Nature* **326**(6115): 740-1.
- Sims, R. J., 3rd, R. Belotserkovskaya, et al. (2004). "Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it." *Genes Dev* **18**(20): 2437-68.
- Sisodia, S. S., B. Sollner-Webb, et al. (1987). "Specificity of RNA maturation pathways: RNAs transcribed by RNA polymerase III are not substrates for splicing or polyadenylation." *Mol Cell Biol* **7**(10): 3602-12.

- Skorski, T. (2002). "BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability." *Oncogene* **21**(56): 8591-604.
- Smith, C. W. and J. Valcarcel (2000). "Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control." *Trends Biochem. Sci.* **25**(8): 381-8.
- Sobell, H. M. (1985). "Actinomycin and DNA transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(16): 5328-31.
- Staley, J. P. and C. Guthrie (1998). "Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things." *Cell* **92**(3): 315-26.
- Tacke, R. and J. L. Manley (1999). "Determinants of SR protein specificity." *Curr Opin Cell Biol* **11**(3): 358-62.
- Taira, Y., T. Kubo, et al. (1998). "Molecular cloning of cDNA and tissue-specific expression of the gene for SII-K1, a novel transcription elongation factor SII." *Genes Cells* **3**(5): 289-96.
- Takeda, S., S. Naruse, et al. (1967). "Effects of ultra-violet microbeam irradiation of various sites of HeLa cells on the synthesis of RNA, DNA and protein." *Nature* **213**(5077): 696-7.
- Taylor, R. C., S. P. Cullen, et al. (2008). "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(3): 231-41.
- Tennyson, C. N., H. J. Klamut, et al. (1995). "The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced." *Nat Genet* **9**(2): 184-90.
- Thompson, N. E., T. H. Steinberg, et al. (1989). "Inhibition of in vivo and in vitro transcription by monoclonal antibodies prepared against wheat germ RNA polymerase II that react with the heptapeptide repeat of eukaryotic RNA polymerase II." *J Biol Chem* **264**(19): 11511-20.
- Urist, M., T. Tanaka, et al. (2004). "p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2." *Genes Dev* **18**(24): 3041-54.
- Vagner, S., C. Vagner, et al. (2000). "The carboxyl terminus of vertebrate poly(A) polymerase interacts with U2AF 65 to couple 3'-end processing and splicing." *Genes Dev* **14**(4): 403-13.
- Valay, J. G., M. Simon, et al. (1995). "The KIN28 gene is required both for RNA polymerase II mediated transcription and phosphorylation of the Rpb1p CTD." *J Mol Biol* **249**(3): 535-44.
- van der Houven van Oordt, W., M. T. Diaz-Meco, et al. (2000). "The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation." *J Cell Biol* **149**(2): 307-16.
- van Hoffen, A., A. S. Balajee, et al. (2003). "Nucleotide excision repair and its interplay with transcription." *Toxicology* **193**(1-2): 79-90.
- Vibe-Pedersen, K., A. R. Kornblihtt, et al. (1984). "Expression of a human alpha-globin/fibronectin gene hybrid generates two mRNAs by alternative splicing." *Embo J* **3**(11): 2511-6.
- Vincent, M., P. Lauriault, et al. (1996). "The nuclear matrix protein p255 is a highly phosphorylated form of RNA polymerase II largest subunit which associates with spliceosomes." *Nucleic Acids Res* **24**(23): 4649-52.
- Vincent, O., S. Kuchin, et al. (2001). "Interaction of the Srb10 kinase with Sip4, a transcriptional activator of gluconeogenic genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **21**(17): 5790-6.
- Vousden, K. H. and X. Lu (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." *Nat Rev Cancer* **2**(8): 594-604.
- Wada, T., G. Orphanides, et al. (2000). "FACT relieves DSIF/NELF-mediated inhibition of transcriptional elongation and reveals functional differences between P-TEFb and TFIIF." *Mol Cell* **5**(6): 1067-72.
- Wada, T., T. Takagi, et al. (1998). "Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro." *EMBO J* **17**(24): 7395-403.
- Wang, E. T., R. Sandberg, et al. (2008). "Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes." *Nature* **456**(7221): 470-6.
- Wang, W., M. Carey, et al. (1992). "Polymerase II promoter activation: closed complex formation and ATP-driven start site opening." *Science* **255**(5043): 450-3.
- Wang, Z., H. M. Hoffmann, et al. (1995). "Intrinsic U2AF binding is modulated by exon enhancer signals in parallel with changes in splicing activity." *RNA* **1**(1): 21-35.
- Wetterberg, I., J. Zhao, et al. (2001). "In situ transcription and splicing in the Balbiani ring 3 gene." *EMBO J* **20**(10): 2564-74.
- Wind-Rotolo, M. and D. Reines (2001). "Analysis of gene induction and arrest site transcription in yeast with mutations in the transcription elongation machinery." *J Biol Chem* **276**(15): 11531-8.

- Xu, Q., T. Nakanishi, et al. (1994). "Cloning and identification of testis-specific transcription elongation factor S-II." *J Biol Chem* **269**(4): 3100-3.
- Yamaguchi, Y., T. Wada, et al. (1998). "Interplay between positive and negative elongation factors: drawing a new view of DRB." *Genes Cells* **3**(1): 9-15.
- Yang, Z., Q. Zhu, et al. (2001). "The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription." *Nature* **414**(6861): 317-22.
- Yin, X. M. (2006). "Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death." *Gene* **369**: 7-19.
- Yonaha, M. and N. J. Proudfoot (1999). "Specific transcriptional pausing activates polyadenylation in a coupled in vitro system." *Mol. Cell* **3**(5): 593-600.
- Yu, Y., P. A. Maroney, et al. (2008). "Dynamic regulation of alternative splicing by silencers that modulate 5' splice site competition." *Cell* **135**(7): 1224-36.
- Zanton, S. J. and B. F. Pugh (2004). "Changes in genomewide occupancy of core transcriptional regulators during heat stress." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(48): 16843-8.
- Zhang, J. and J. L. Corden (1991). "Identification of phosphorylation sites in the repetitive carboxyl-terminal domain of the mouse RNA polymerase II largest subunit." *J Biol Chem* **266**(4): 2290-6.
- Zhang, M. Q. (1998). "Statistical features of human exons and their flanking regions." *Hum Mol Genet* **7**(5): 919-32.
- Zhang, Z. and D. S. Gilmour (2006). "Pcf11 is a termination factor in Drosophila that dismantles the elongation complex by bridging the CTD of RNA polymerase II to the nascent transcript." *Mol Cell* **21**(1): 65-74.
- Zhou, Z., L. J. Licklider, et al. (2002). "Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome." *Nature* **419**(6903): 182-5.
- Zhu, J., A. Mayeda, et al. (2001). "Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins." *Mol Cell* **8**(6): 1351-61.
- Zuzarte-Luis, V. and J. M. Hurle (2002). "Programmed cell death in the developing limb." *Int J Dev Biol* **46**(7): 871-6.